R.H.A.C.

MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR
A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. A. PANETH - Mainz
R. STREBINGER - Wien · C. L. WILSON - Belfast
M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS
E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF
M. K. ZACHERL - Wien

1957
FÜNFTES HEFT
MIT 32 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 23. JULI 1957

LIBRARY
FOR REFERENCE ONLY

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1957

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint ab 1957 zu einem festen Jahresbezugspreis. Im Jahre 1957 wird ein Band von etwa 800 Seiten Umfang zum Jahresbezugspreis von S 660.—, DM 110.—, sfr. 113.—, $ 26.—, £ 9/7/- erscheinen. Der Band setzt sich aus 6 Heften zusammen, die in Abständen von etwa 2 Monaten herausgegeben werden.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:

Editor of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:

Dr. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:

Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:

Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:

Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: 63 76 71 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1957 **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Seite

Westland, A. D., and **F. E. Beamish.** The Separation and Determination of the Platinum Metals on a Microscale 625

Senise, P. Spot Test for Sulfites Based on the Induced Oxidation of Cobalt-Azide Solutions 640

Gibson, D. T., and **J. Currie.** Molecular Weight Determination on a Hot-Stage Microscope 644

Takahashi, M., M. Kawane, and **T. Mitsui.** Determination of Oxygen in Titanium by the Micro Bromination Method 647

Maurice, M. J., and **J. W. Y. Heynis.** Description of a New Type of Parr Bomb 658

Maurice, M. J., and **J. L. Mulder.** The U. V. Spectrophotometric Determination of Potassium Ethylxanthate 661

Tomic, E., und **H. Khalifa.** Photometrische Bestimmung von Thorium mit Quercetin 668

Inglis, A. S. The Microdetermination of Alkoxyl Groups 677

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

University of Toronto, Toronto, Canada

The Separation and Determination of the Platinum Metals on a Microscale

By

A. D. Westland and F. E. Beamish

(Received November 12, 1956)

The principal sources of platinum metals are ore deposits. In practically all of these the proportions of total precious metals are of the order of micrograms per ounce (28 g) of ore. No direct method of determination has been recorded. The few procedures used in practice involve some form of concentration, and the one most generally used requires collection of the platinum metals by lead to form a mixed alloy. The weight of this alloy is only a little less than the original ore but there is now the advantage of the relatively simple isolation by cupellation of the microgram amounts of platinum metals. The composition of this small precious metal residue includes what is sometime called the "insoluble" and sometimes "iridosmine". The latter term is practically never justified by data; it is only a traditional convenience. No method has ever been recorded for the direct determination of the composition of the insoluble residue.

This is also the situation in connection with the analysis of the crystals which often make up the naturally occurring iridosmines. The few recorded compositions of these iridosmines do not include a statement of the method of analysis and for various reasons it would seem safe to conclude that the recorded constituents were obtained from relatively large nuggets. There is indisputable evidence that some of these so-called iridosmines contain mechanically mixed constituents of different crystallographic structure and different compositions. The difficulty confronting the analyst here, as in the case of the "insolubles" in the lead alloy, is a lack of micro methods for the separation and determination of microgram amounts of each of the platinum metals. It has frequently been assumed that the well established macromethods for the separation and determina-

tion of the platinum metals are applicable to trace amounts but experiments in the authors' laboratory over a period of several years have shown that certain of these separations fail on the micro scale. In particular may be cited the incomplete distillation of ruthenium and the uncertain separation of titanium from iridium by cupferron. At best, the hydrolytic separation of platinum would always be suspect when the precipitate amounts to only a few micrograms. The difficulties encountered when precipitation is initiated and the appearance of colloidal precipitates in very dilute solution are conditions which the best technique may not be able to avoid.

A simple chromatographic method has been developed which is assumed to be applicable after osmium and ruthenium have been removed by conventional distillations[1]. This procedure is reported to be applicable in the presence of 50 mg of sulfuric acid but this is of little advantage in the present case since the solutions resulting from the distillations contain considerable sulfuric acid. It is clear that the precious metal constituents would have to be isolated from the distillation residue before proceeding with the chromatographic process.

The Separation and Determination of Ruthenium and Osmium

The author's previous method for the separation of ruthenium and osmium was intended for the analysis of fire assay buttons and involved the use of perchloric acid as a solvent for lead. The procedure avoided the use of nitric acid which prevented accurate determination of ruthenium[2]. The method involved isolating the ruthenium and osmium by distilling from fuming perchloric acid and subsequently selectively distilling osmium by boiling the peroxide receiving solution.

Through oxidation with hydrogen peroxide it was found possible to distill osmium alone from a solution of the chloro salts of the platinum group when perchloric acid is not present, thus simplifying the analysis by eliminating one of the distillations. However hydrogen peroxide alone will not serve to oxidize the osmium when present as chloro-osmate ion, but if the oxidation is carried out at sufficiently high temperature, the distillation from a sulfuric acid-hydrogen peroxide solution is complete.

Procedure 1, described below, was devised for the distillation of osmium followed by either gravimetric or colorimetric determination. Osmium-thionalide did not coagulate properly due to the invariable presence of sulfuric acid in the distillates. Precipitations by 2-phenylbenzothiazole[3] were therefore preferable. Precipitation did not occur, however, from distillates unless they had been heated in the presence of hydroxylamine. The precipitate formed very slowly so that samples were allowed to stand for at least 24 hours before filtering. It was found that washings with 0.2 *N* hydrobromic acid sometimes contained osmium,

but that 2 *N* hydrochloric acid dissolved only negligible quantities of the precipitate. For the colorimetric determination of osmium the procedure used was that described previously[2], except that 5% instead of 2% thiourea solution was used for absorbing the osmium. This was done to ensure that an excess of thiourea persisted in spite of its destruction by chlorine evolved from hydrochloric solutions in the distillation flask. A precipitate usually formed in the receiving vessels but dissolved when the receiving liquid was diluted to volume. Large amounts of osmium were collected in twice the volume of thiourea solution and diluted to 100 ml. Increased sensitivity for small amounts of osmium was obtained by using a 5-cm absorption cell.

The procedure was tested by adding aliquots of a standardized osmium solution or weighed portions of standardized ammonium chloro-osmate to the distillation flask containing 30 ml of 9 *M* sulfuric acid.

Determination of Osmium

Apparatus

The distillation apparatus was similar to that used previously[2] except that the flask was provided with a thermometer inserted through a ground glass joint in the wall.

Reagents

The inorganic reagents used were of analytical grade. The alcohol was commercial grade 95% ethanol. The thiourea was British Drug Houses "Certified Chemical".

Procedure 1

Five milliliters of concentrated perchloric acid are placed in the trap and, depending on the type of determination to be used, 15, 5 and 5 ml respectively, of either 40% hydrobromic acid or 5% thiourea in 1 : 1 ethanol-hydrochloric acid, are placed in the three receivers. Absorption in 40, 5, and 5 ml of thiourea solution is advised for the colorimetric determination of larger quantities of osmium.

Ten percent hydrogen peroxide is added dropwise to the distillation flask while its contents are being distilled into the trap. After the temperature has reached 115° C, the boiling and addition is continued for fifteen minutes. During this time the trap solution is boiled under reflux. The pot is allowed to cool to 30 or 40° C, and 25 ml of water and 5 ml of 30% hydrogen peroxide are added in succession. This solution and that in the trap are finally boiled for 15 minutes.

For gravimetric determination, the receivers are rinsed with 1 : 4 hydrobromic acid into a 250-ml beaker. Two hundred milligrams of

hydroxylamine hydrochloride are added and the solution placed on a steam bath for 0.5 hour. Samples are precipitated with sufficient 2-phenylbenzothiazole to provide a supernatant liquid containing at least 0.8 mg of reagent per milliliter. After about 45 hours at most, the samples are filtered, reduced, and weighed. Colorimetric determinations are carried out as described[2], the standards being distilled in the same manner as the samples. Results for samples determined by both methods are recorded in Table I.

Table I. Recovery of Osmium

No.	Method of determination	Os taken mg	Os recovered mg	Error mg
1	gravimetric	7.55	7.58	+ 0.03
2	,,	9.05	9.03	— 0.02
3	,,	5.09	5.13	+ 0.04
4	,,	1.97	1.97	0.00
5	colorimetric	0.995	1.000	+ 0.005
6	,,	1.29	1.27	— 0.02
7	,,	1.18	1.15	— 0.03

Determination of Ruthenium

Bromic acid solution was obtained by adding a stoichiometric quantity of sulfuric acid to a hot nearly saturated solution of barium bromate. The barium bromate was prepared according to the method of *Pearce* and *Russell*[4].

Table II. Effect of Preliminary Heating on the Recovery of Ruthenium

No.	100.9 mg of Ru taken		
	Temperature of heating ° C	Ru recovered μg	Error μg
1	150 ± 3	74.9	— 26.0
2	125 ± 3	80.7	— 20.2
3	115 ± 5	101.2	+ 0.3
4	105 ± 5	100.8	— 0.1

During the distillation of ruthenium the amount of salt in the mixture must be kept small to avoid interference in the subsequent analysis of the pot mixture. Consequently bromic acid was used for this oxidation instead of the customary sodium bromate solution.

Complete retention of ruthenium in the flask was verified by treating a ruthenium aliquot according to the procedure for osmium distillation but the vapors were passed into chilled 3% hydrogen peroxide. The receiving liquid was in turn placed in the distillation flask, acidified with a little sulfuric acid and boiled upon adding sodium bromate solution. A colorimetric test on the distillate from this second distillation failed to reveal the presence of ruthenium.

When sulfuric acid solutions of ruthenium were heated strongly during the distillation it was found that some ruthenium was volatilized, but, if an excess of peroxide was always present during the distillation of osmium and the temperature was not allowed to exceed 120° C, the subsequent recoveries of ruthenium were quantitative. The effect of temperature on the losses of ruthenium during distillation from sulfuric acid solutions of peroxide is shown in Table II. Ten percent hydrogen peroxide was continuously added dropwise during the distillations.

The pot residue from experiment I was fumed with 5 ml of perchloric acid at 170° C, the vapours being passed into 1 : 1 ethanol-hydrochloric acid. Ruthenium was not detected in this distillate. Presumably the ruthenium remaining in the pot liquid is converted into a very stable sulfate complex.

Procedure 2

Following the osmium distillation, the solution is allowed to cool and diluted to three times its volume with water. The solution is boiled until the decomposition of peroxide appears complete. Five milliliter of a solution of bromic acid (approximately 5%) are added, and the solution is boiled for fifteen minutes. The vapors are passed through the trap containing 10 ml of 1 : 1 sulfuric acid and into the receivers containing 15, 5, and 5 ml respectively of 1 : 1 ethanol-hydrochloric acid solution. Five milliliters more of bromic acid solution are added to the distillation flask and 5 ml to the trap. Both pot and trap liquids are boiled for 15 minutes. The colorimetric determination of ruthenium by thiourea is carried out as described previously[2].

Separation of Osmium from Ruthenium

The two distillations were carried out consecutively on samples containing both osmium and ruthenium, osmium being distilled first. Results for the separations and the colorimetric determinations appear in Table III.

Table III. Separation of Osmium from Ruthenium

No.		Metal taken μg	Metal recovered μg	Error μg
1	Ru	40.0	36.8	— 3.2
	Os	$1.45 \cdot 10^3$	$1.45 \cdot 10^3$	nil
2	Ru	19.8	20.1	+ 0.2
	Os	32.3	31.2	— 1.1
3	Ru	80.0	76.0	— 4.0
	Os	64.6	64.0	— 0.6
4	Ru	40.0	40.7	+ 0.7
	Os	16.2	17.1	— 0.9

Treatment of the Distillation Residue and Separation of Platinum and Palladium

In the usual scheme of separation on a macro scale, palladium, rhodium, and iridium are separated from platinum by hydrolytic precipitation[5]. This procedure, as pointed out above, is not advisable when the quantities to be precipitated are very small. The separation is particularly inadvisable from a sulfuric acid medium which has been fumed. However, in a previous publication[6] it was shown that micro amounts of iridium may be precipitated as hydrated oxide and collected quantitatively with nickel hydroxide. Thus it seemed worthwhile to attempt the application of this method. Under the conditions used, however, platinum was extensively precipitated so that quantitative isolation of iridium at this point is not to be expected. It is probable that the fuming with sulfuric acid was responsible for this behavior. Separation of the platinum remaining in the sulfuric acid solution was accomplished by an extraction procedure. The authors were able to extract platinum complexed with 4-phenylthiosemicarbazide from solutions which had been fumed with sulfuric acid. A precipitate is formed with this reagent in neutral solutions of platinum[7] and may be removed by extracting with hexone*. Extraction is preferable to filtration because with the latter, small losses to the filtrate occur. Although the solid complex preferentially enters the organic phase it is not entirely dissolved by the hexone if more than a trace is present. The details of the method are described below in Procedure 3. This hydrolytic precipitation, carried out in the presence of a carrier substance, followed by Procedure 3 would probably serve to prepare the sample for chromatographic separation. However all of these approaches were abandoned in favor of one based on procedures which should be of more general applicability.

It should be recorded that consideration was given to the solvent extraction of platinum and palladium from the remaining members of the group by the method described by *Pollard*[8–11]. In this method platinum is reduced to the divalent state by means of stannous chloride or iodide. Both of these reagents interfered, however, with subsequent operations.

The authors found that platinum and palladium are precipitated quantitatively when the chloro salt solutions of these metals are boiled with tellurium dust. The two noble metals may then be either separated or determined by a differential method. A previous publication[12] deals with a method of separation of rhodium from iridium applicable to such a medium.

When solutions of platinum metals have been subjected to the above treatments for removing osmium and ruthenium, fumed down to 1-ml

* Methyl iso-butyl ketone.

volume, diluted to about 10 ml, and boiled with tellurium dust, much, sometimes most, of the platinum remains in solution. Palladium is precipitated quantitatively, regardless of the previous treatment of the sample. Thus platinum, like ruthenium, resists separation if converted to sulfate complex. If the solution of the sulfate complex is diluted with a little water and then boiled with concentrated hydrochloric acid, the platinum may subsequently be precipitated.

Rhodium behaves similarly, for under certain circumstances it does not pass quantitatively into the filtrate. It is largely precipitated by tellurium from hydrochloric acid, but not from fumed sulfuric acid solutions. Rhodium in chloride solution may be converted to the desired form by evaporating in the presence of sulfuric acid until a faint indication of sulfur trioxide fumes appears; furthermore due to the stability of the chloroplatinate, a mild fuming with sulfuric acid does not impair the platinum recovery. In the final stages of the evaporation, rhodium precipitates when present in amounts in excess of about 200 μg. The precipitate redissolves upon adding water.

During the precipitation of platinum and palladium, iridium is reduced to a slight extent to the metal. Apparently the reduction is favored thermodynamically, but the rate is extremely slow. A further difficulty is the catalysis of this reduction by palladium. If a sample contains more than a few micrograms of palladium (more than about 20 μg), the operator is advised to separate it before platinum is precipitated. Procedures which may be suggested are the extraction of the diethyldithiocarbamate complex[8–11] and extraction of the dimethylglyoxime complex[13,14]. The authors did not investigate thoroughly the separation of palladium at this stage, but in this work restricted the quantity of palladium handled.

The tellurium was added to the sample in the form of a fine powder. It was prepared without difficulty by grinding small chips of tellurium in an agate mortar. The particles should be fine enough to form a suspension in the boiling sample.

It was necessary to remove from the platinum-palladium filtrate most of the dissolved tellurium in order to avoid interference in subsequent operations. This was accomplished by simply precipitating it as the metal before the filtration. A rapid and effective method of reducing tellurious acid consists of catalysing by means of iodide the reaction with sulfite[15]. The extremely small quantity of iodide used did not interfere with the determination of rhodium. The amount of iodide used must be small for another reason. A high concentration causes the reduction of sulfur acids to sulfur and even to hydrogen sulfide. Since the precipitation is normally efficient only in 2 to 4 N hydrochloric acid it was necessary empirically to standardize the conditions when

sulfuric acid was present. A chloride normality of 3 to 4 was found to be desirable. The tellurium precipitate coagulates upon warming but since it is liable to be partially redissolved, coagulation was effected at room temperature by agitating for a few minutes. The precipitate was prone to peptize and it was ultimately decided to wash with a solution of 3 *N* hydrochloric acid containing 0.2% sodium metabisulfite. It is necessary to remove most of the tellurium from the platinum-palladium fraction as well, to avoid interference with the colorimetric determination of these elements. *Hagen*[16] removed tellurium from platinum by volatilizing the former as metal but the present authors found that heating in air resulted in extensive oxidation so that the separation is far from complete. Consequently the precipitate was caught on paper which then was charred in air over a low flame. The residue was subsequently heated in hydrogen. The charring in air was necessary to prevent the formation of tar while heating in hydrogen. This procedure keeps the production of TeO_2 to a minimum.

Evidence that little, if any, platinum or palladium escapes precipitation with tellurium was obtained by testing combined filtrates from several samples which had contained no rhodium or iridium. The colorimetric procedures using *p*-nitrosodimethylaniline[17,18] were used as qualitative tests. The absence of discernible color satisfied the authors that filtrate losses were probably less than one microgram.

Losses by precipitation or coprecipitation of small quantities of rhodium and iridium were easily detected after volatilizing the tellurium in hydrogen and examining the residue under a 50 power microscope. A few micrograms of either metal formed an easily recognizable sponge after the volatilization. Some idea of the quantities was obtained by dissolving iridium in aqua regia and rhodium in concentrated sulfuric acid and applying the stannous chloride procedures[19,21] as qualitative tests.

From microscopic evidence, attack of the iridium residue by aqua regia appeared largely to be complete. The isolation of platinum and palladium was carried out as described below in Procedure 4.

Procedure 3

Samples of platinum stock solution were placed in 50-ml beakers and 0.5 ml of concentrated sulfuric acid and 5 ml of 10% sodium bromate solution were added. The samples were fumed strongly, cooled, diluted, and neutralized with sodium hydroxide solution, using bromocresol purple as indicator. Five milliliters of Na_2HPO_4—KH_2PO_4 buffer, one molar in phosphate and having a p_H of 7 were added. Five milliliters of 0.5% 4-phenylthiosemicarbazide (Eastman Kodak No. 5426) in 50% ethanol were added to the hot solution and the resulting precipitate

allowed to digest for one hour on the steam bath. The samples were shaken with two 5- and two 2.5-ml portions of hexone. The extracts were combined and evaporated to dryness on the steam bath in 50-ml beakers. The beakers were placed in a muffle furnace and heated overnight at 450 to 500° C. The residues were treated with aqua regia and with hydrochloric acid in the presence of sodium chloride and the platinum was determined with stannous chloride[21]. The results of six determinations are given in Table IV.

Table IV. Solvent Extraction of Platinum with 4-Phenylthiosemicarbazide

No.	Pt taken μg	Pt recovered μg	Error μg
1	1000	994	— 6
2	1000	970	— 30
3	20.0	24.0	+ 4
4	20.0	19.5	— 0.5
5*	20.0	21.8	+ 1.8
6	20.0	19.1	— 0.9

* This high result was probably due to a shorter time of ignition (2 hours) in the muffle furnace.

Procedure 4

The residue from the ruthenium distillation in procedure 2 is evaporated and fumed to about 1 ml volume at a moderate temperature. After cooling, the solution is diluted with a little water and 5 ml of concentrated hydrochloric acid is added. The sample is boiled for 0.5 hour, adding hydrochloric acid as required to maintain the volume. At the end of this time, the cover glass is displaced and the solution evaporated until it just begins to evolve faint fumes of sulfuric acid. The solution is diluted to 10 ml; after allowing it to cool, approximately 50 mg of tellurium powder are added and the sample is boiled vigorously for 10 minutes. After allowing the solution to evaporate to 8-ml volume, 3 ml of concentrated hydrochloric acid, a few crystals of sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$), and one drop of 1% hydriodic acid are added. The sample is kept agitated by gently swirling for about 15 minutes and a few more crystals of metabisulfite are added. The sample is filtered through a 4.25-cm Whatman No. 42 paper and the precipitate transferred to the filter and washed with the wash solution. The filtrate is reserved for the rhodium and iridium determination. The filter is placed in a 5-ml silica crucible and charred over a low flame. The crucible is transferred to a combustion tube and heated over a Meker burner for 15 minutes in a stream of hydrogen. The paper is finally completely burned by heating strongly in air. The residue is brought into solution by placing the crucible upright in a beaker, filling with aqua-regia, and heating on the steam bath for 3 hours. The crucible is removed from the beaker with a glass rod, rinsed, and the solution evaporated to dryness in the presence of 40 mg of sodium chloride and then evaporated three times with hydrochloric acid to complete dryness. The residue is dissolved in water and the platinum and palladium are determined as described in procedure 5.

Determination of Platinum and Palladium

The colorimetric determination with *p*-nitrosodimethaniline was used instead of stannous chloride since, with the former reagent, tellurium does not interfere. The original authors pointed out that *p*-nitrosodimethaniline must be dissolved in freshly distilled alcohol since otherwise erratic results are obtained. However, it was observed in this laboratory that an aqueous solution of the reagent afforded a precision markedly better than that obtained with the alcoholic reagent. It may be admitted that the aqueous reagent also has some disadvantages. The reagent is not easily soluble in water and some solid has to be removed by filtration. This means that the concentration of the reagent solution cannot be closely reproduced and that, consequently, standards have to be prepared for each lot of reagent. This is objectionable because the reagent solution so prepared cannot be kept for more than a day or two without depositing a precipitate. (The differential method of analysis cannot be used, since palladium accentuates the deviations from *Beer*'s Law.) The alcoholic reagent is superior from the standpoint of stability.

Table V. Recovery of Palladium

No.	Palladium taken	Palladium recovered	Error
1	20.3 μg	20.9 μg	+ 0.6 μg
2	20.3 μg	20.9 μg	+ 0.6 μg
3	20.3 μg	20.3 μg	0.0 μg
4	1.00 mg	1.00 mg	0.0 mg
5	1.00 mg	0.99 (2) mg	— 0.008 mg

Table VI. Recovery of Platinum

No.	Platinum taken	Platinum recovered	Error
1	20.0 μg	22.3 μg	+ 2.3 μg
2	20.0 μg	19.1 μg	— 0.9 μg
3	20.0 μg	20.6 μg	+ 0.6 μg
4	20.0 μg	20.6 μg	+ 0.6 μg
5	100.1 μg	97.3 μg	— 2.8 μg
6	100.1 μg	98.6 μg	— 1.5 μg
7	100.1 μg	99.8 μg	— 0.3 μg
8	1.00 mg	1.03 mg	+ 0.03 mg
9	1.00 mg	1.00 mg	0.00 mg
10	2.00 mg	2.00 mg	0.00 mg

Samples of palladium or platinum alone were carried through procedure 5 and the results are recorded in Tables V and VI. Blanks for the palladium determination were negligible and for the platinum determination amounted to about 2 μg.

Procedure 5

Solution containing 165 mg of the *p*-nitrosodimethylaniline (Distillation Products Industries No. 188) in 100 ml of aqueous solution was prepared by stirring the hot mixture for 30 minutes and filtering. Three milliliters of this solution were added to the samples buffered at p_H 2.2. The samples

were heated for 25 minutes at 85° C and diluted to 50 ml volume. Transmittance was measured in a 5-cm cell at 515 mm. These conditions were chosen following a study of heating time and the effect of acidity.

The Separation and Determination of Rhodium

Rhodium is separated from iridium by precipitation with antimony dust[12]. The filtrate from the tellurium treatment is prepared for this process by evaporating to light fumes in order to eliminate most of the sulfur dioxide. The remainder of the procedure is the same as that described[12].

There is usually a small amount of tellurium in the separated rhodium and this causes a slight darkening of the sample when stannous chloride is used as the color reagent. If the sample is allowed to stand, the tellurium coagulates so that it may be removed with a fine texture filter paper. Since tellurium does not interfere in the method for rhodium using 2-mercapto-4,5-dimethylthiazole[12], this was used in preference to stannous chloride. It should be noted, however, that the blank error is high if the solutions are not filtered before making the absorbance measurements. The blank error on filtered samples was of the order of 0.4 μg.

Table VII. Recovery of Rhodium

Weight of rhodium taken = = 41.2 μg

No.	Rhodium recovered μg	Error μg
1	41.6	+ 0.4
2	38.5	— 2.7
3	39.6	— 1.6
4	41.9	+ 0.7
5	38.8	— 2.4
6*	38.6	— 2.6

* This sample initially contained 1.00 mg platinum.

The results obtained for solutions of rhodium treated by Procedure 4 and by antimony[12] are shown in Table VII. The accuracy, not unexpectedly, is lower for rhodium than for platinum or palladium.

The Determination of Iridium

A procedure has recently been developed for the determination of iridium by stannous chloride in a bromide medium[20]. It is applicable in the presence of small quantities of antimony. The quantity of antimony dissolved during the removal of rhodium is sufficient to produce a considerable blank error and since this quantity cannot be expected to be reproducible, the authors chose to separate antimony by distillation of the trichloride[12] as in their original procedure. When the quantity of iridium to be determined was large and a relatively small aliquot had to be taken, the antimony interference was correspondingly reduced so that the distillation could frequently be omitted.

Even when the antimony had been removed, a dense red color appeared in the samples when the colorimetric procedure was applied. The color disappeared, however, when the samples were diluted to volume. A final volume of 50 ml is required for best results. This dilution of the sample reduces the hydrobromic acid concentration, thus allowing the colored bromo-complexes to be dissociated.

Samples were prepared for the determination by first fuming the sulfuric acid solutions to about 1 ml volume when necessary, and boiling for 45 minutes with concentrated hydrochloric acid containing a few drops of 30% hydrogen peroxide.

Separation and Determination of the Six Platinum Metals

The scheme of separation is summarized by the flow sheet given below. Samples of various compositions were carried through the procedures. The results of Table VIII show that, with but few exceptions, good recoveries were obtained.

Scheme of Separation

Os, Ru, Pt, Pd, Rh, Ir
+ H_2SO_4 + H_2O_2
Procedure 1

Os
Reagents: Thiourea, 2-phenylbenzothiazole

Ru, Pt, Pd, Rh, Ir
+ $HBrO_3$
Procedure 2

Ru
Reagent: Thiourea

Pt, Pd, Rh, Ir
+ Te. dust
Procedure 3, 4

Pt, Pd
Reagent: p-Nitrosodimethylamine

Rh, Ir
+ Sb
Procedure
of reference 12

Rh
Reagent: 2-Mercapto-4, 5, dimethylthiazole

Ir
Reagent: $SnBr_2$

Acknowledgment

The authors are grateful for financial assistance from the National Research Council of Canada.

Table VIII. The Separation of the Platinum Group

No.	Os		Ru		Pd		Pt		Rh		Ir	
	t	r	t	r	t	r	r	r	t	r	t	r
1	32.3	31.2	40.3	39.8	20.1	19.5	20.0	—	20.6	—	39.0	—
2	32.3	31.2	40.3	38.5	201	200	20.2	—	20.6	—	1.95 mg	—
3	65.2	62.5	80.7	79.6	20.1	19.0	1.00 mg	—	20.6	—	39.0	—
4	16.3	16.1	8.1	8.6	4.0	4.2	1.00 mg	—	8.3	—	7.8	7.4
5	644	644	40.3	42.8	40.2	40.4	40.2	—	41.2	41.5	716	720
6	1.32 mg	1.32 mg	20.1	19.4	20.1	19.4	20.0	20.2	20.6	20.4	1.95 mg	1.90 mg
7	1.31 mg	1.34 mg	20.1	19.4	20.1	19.4	20.0	20.0	20.6	19.3	1.95 mg	1.90 mg
8	—	—	—	—	20.1	20.2	20.0	15.8	20.6	19.6	9.75	12.7
9	—	—	—	—	101	100	101	101	103	105	195	191
10	—	—	—	—	20.1	20.1	20.0	18.7	41.2	40.2	1.43 mg	1.43 mg
11	—	—	—	—	20.1	20.0	20.0	19.2	41.2	39.4	1.43 mg	1.39 mg
12	—	—	—	—	20.1	20.4	1.00 mg	1.01 mg	20.6	18.2	9.75	10.4

"t" denotes "taken", "r" denotes "recovered".
All quantities are in micrograms except where otherwise stated.

Summary

This report records procedures for the determination of microgram quantities of the six platinum metals. The methods will have application to the analysis of small crystals of the minerals of the platinum group, particularly iridosmines and to the analysis of the "insoluble" portion of assay buttons and beads.

The scheme incorporates several new methods of separation and makes use of a variety of the most suitable methods of determination. Variations in these methods have been introduced in order to increase their efficiency and to invite their use.

Zusammenfassung

Ein Arbeitsgang für die Trennung und kolorimetrische Bestimmung von Mikrogramm-Mengen der sechs Platinmetalle wird beschrieben. Er wurde für die Analyse kleiner Kristalle von Platinerzen, besonders von Osmiridium, und „unlöslicher" Rückstände, die bei der Untersuchung von Kupellationsperlen auftreten, ausgearbeitet und enthält mehrere neue Trennungsverfahren, an die sich die geeignetsten Bestimmungsverfahren anschließen. Die hierfür ausgearbeiteten Verbesserungsvorschläge sollen zu vermehrter Anwendung anregen.

Résumé

Description de techniques de détermination des 6 métaux de la mine du platine en quantité de l'ordre de grandeur du microgramme. Ces méthodes sont applicables à l'analyse de petits cristaux de minéraux du groupe du platine, en particulier à celle des osmiures d'iridium et à celle de la fraction «insoluble» des boutons et perles d'essai.

Le schéma analytique comporte plusieurs méthodes nouvelles de séparation et met en oeuvre un certain nombre de méthodes de détermination choisies parmi les plus commodes. Les auteurs leur ont apporté des modifications afin d'accroître leur rendement.

Literature

[1] *N. F. Kember* and *R. A. Wells*, Analyst **80**, 735 (1955).

[2] *A. D. Westland* and *F. E. Beamish*, Analyt. Chemistry **26**, 739 (1954).

[3] *I. Hoffman*, *J. E. Schweitzer*, *D. E. Ryan*, and *F. E. Beamish*, Analyt. Chemistry **25**, 1091 (1953).

[4] *D. W. Pearce* and *R. G. Russell*, Inorganic Syntheses, Vol. II ed. by *W. C. Fernelius* New York: McGraw-Hill. 1946. p. 20.

[5] *R. Gilchrist* and *E. Wichers*, J. Amer. Chem. Soc. **57**, 2565 (1935).

[6] *A. D. Westland* and *F. E. Beamish*, Analyt. Chemistry **27**, 1776 (1955).

[7] *J. G. Fraser*, unpublished work.

[8] *W. B. Pollard*, Analyst **67**, 184 (1942).

[9] *W. B. Pollard*, Bull. Inst. Mining Met. **400**, 6 (1938); **401**, 19; **402**, 31; **406**, 11; **410**, 23; **411**, 27; **417**, 9 (1939).

[10] *W. B. Pollard*, Trans. Inst. Mining Met. **47**, 331 (1938).

[11] *W. B. Pollard*, Trans. Inst. Mining Met. **48**, 65 (1939).

[12] *A. D. Westland* and *F. E. Beamish*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1474.

[13] *R. S. Young*, Analyst **76**, 49 (1951).

[14] *J. G. Fraser*, *F. E. Beamish*, and *W. A. E. McBryde*, Analyt. Chemistry **26**, 495 (1954).

[15] *A. A. Noyes* and *W. C. Bray*, J. Amer. Chem. Soc. **29**, 202 (1907).

[16] *S. K. Hagen*, Mikrochem. **15**, 180 (1936).

[17] *L. G. Overholser* and *J. H. Yoe*, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 3224 (1941).

[18] *J. J. Kirkland* and *J. H. Yoe*, Analyt. Chemistry **26**, 1340 (1954).

[19] *E. B. Sandell*, Colorimetric Determination of Traces of Metals, 2nd ed. New York: Interscience Publishers Inc. 1950. p. 523.

[20] *S. S. Berman* and *W. A. E. McBryde*, Analyst **81**, 566 (1956).

[21] *G. H. Ayres* and *A. S. Meyer*, Analyt. Chemistry **23**, 299 (1951).

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Spot Test for Sulfites Based on the Induced Oxidation of Cobalt-Azide Solutions*

By

Paschoal Senise

(Received January 28, 1957)

A thorough study of aqueous and aqueous-organic solutions containing Co^{2+} and N_3^- ions has shown that complex ions may exist in such media, the ratio of $Co^{2+} : N_3^-$ varying from 1 : 1 to 1 : 4. It has also been found that solutions containing an excess of N_3^- are autoxidizable[1]. Complexes of tervalent cobalt up to a 1 : 6 ratio of cobalt to azide were found to occur in the oxidized solutions. This autoxidation, which takes place even in slightly acidic media, is a slow process but can be considerably accelerated by the presence of minute amounts of soluble sulfites.

On the basis of these findings spot tests for the detection of both cobalt and sulfites have been developed. In this paper the test for sulfites is reported.

Experimental

Reagents and solutions:

1.5% acid solution of $Co(NO_3)_6 \cdot 6\,H_2O$ ($p_H = 5$),
saturated solution of sodium azide,
saturated solution of mercuric chloride,
0.2% solution of *o*-tolidine in 2% acetic acid (0.10 g of *o*-tolidine dissolved in 2 ml acetic acid, diluted to 20 ml with water),
dilute hydrochloric acid.

Procedure: A drop of the cobalt solution is placed on filter paper and treated with a drop of saturated sodium azide solution. On the blue violet spot formed, a drop of the test solution (p_H 5–6) is added.

* Part of a communication presented at the XVth International Congress for Pure and Applied Chemistry, Lisbon, September 1956.

If sulfites are present a light yellow color appears which changes to blue by spotting with a drop of *o*-tolidine solution.

Limit of identification: 0.5 μg $NaHSO_3$. Dilution limit: 1 : 100000 (on Whatman N° 1 filter paper).

Interferences: Interferences were investigated by taking in every case one drop of solution containing 5 μg of $NaHSO_3$ and 500 μg of foreign ion.

The following anions were found not to interfere: Cl^-, Br^-, F^-, SCN^-, NO_3^-, ClO_4^-, SO_4^{2-}, SeO_3^{2-}, WO_4^{2-}, $HAsO_3^{2-}$, $B_4O_7^{2-}$, PO_4^{3-}. Ac^-, $C_2O_4^{2-}$.

Sulfides which form black cobaltous sulfide should be previously removed by precipitation with, for instance, cadmium ions.

Cyanides and, when in large amounts, hypophosphites, give positive tests. Iodides, phosphites, molybdates and thiosulfates may inhibit the reaction.

In the presence of iodide, hypophosphite, phosphite and molybdate ions, sulfites can be detected by liberating SO_2 through the addition of dilute mineral acid and testing the evolved gas.

Thiosulfates in small amounts do not inhibit the test. It was found that 5 μg of $NaHSO_3$ could be clearly detected in the presence of 35 μg of $Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$. Large amounts of thiosulfate can be removed with mercuric chloride by the precipitation of mercuric sulfide as indicated by *Feigl*[2]. The subsequent identification of sulfite, however, cannot be performed directly with the supernatant solution since it was found that large concentrations of mercuric salts prevent the identification of small amounts of sulfites. SO_2 should then be evolved and recognized in the same manner as indicated when iodides, phosphites or hypophosphites are present.

Attempts to prevent cyanide interference by the same treatment with mercuric chloride were not fully successful.

Ions which are known to oxidize sulfites under the conditions of the test or to react with azide as, for instance, MnO_4^-, BrO_3^-, IO_3^-, NO_2^-, etc. were not tested.

Test for sulfites in the presence of iodides, hypophosphites, phosphites and molybdates

To a drop of the test solution in a microtube add a drop of dilute hydrochloric acid. Hold at the open end of the tube a piece of filter paper spotted with cobalt and sodium azide solutions and heat the tube gently in a water bath (small beaker). The liberated SO_2 is recognized by the formation of a yellow fleck which turns blue by treatment with *o*-tolidine solution. Care should be taken to expose the border of the spot to the vapors of SO_2 since the cobalt-azide solution tends to spread out by capillary diffusion, the central zone of the spot being thus less sensitive to the reaction.

Test for sulfites in the presence of thiosulfates

To a drop of the test solution in a microtube add a drop of saturated mercuric chloride solution. After a minute, acidify with a drop of dilute hydrochloric acid and proceed as indicated for the identification of sulfites in the presence of iodides, hypophosphites, etc.

Discussion

In order to study the nature of the reaction, experiments were carried out in absence of atmospheric oxygen. Solutions of cobalt(II) salts containing excess sodium azide and minute amounts of sodium hydrogen sulfite were kept in closed vessels under nitrogen. No sign of oxidation could be detected in the blue violet solutions even after several hours in contrast with the controls run in open vessels. By opening the reaction vessels, however, the solutions turned yellow brown almost immediately. Since the experiments described above show that atmospheric oxygen plays a definite role in the reaction, the phenomenon was interpreted in terms of an induced reaction, i. e., it is believed that the autoxidation of sulfurous acid induces the oxidation of cobalt from the divalent to the tervalent state.

It is known that the oxidation of sulfurous acid can activate other oxidation reactions[3] and a sensitive test for sulfite has been developed by *Feigl* and *Fränkel*[4] based on the transformation of green hydrated nickel(II) oxide to black hydrated nickel(IV) oxide through the autoxidation of SO_2. It should be pointed out however that unlike this latter case, the induced action described in this paper takes place in a homogeneous system, i. e., in solution. In this connection it must be noted that yellow brown oxidized solutions of cobalt and azide ions are decolorized by dilution due to the low stability of the tervalent cobalt complexes contained in such solutions[1]. For this reason the analytical applications of these findings in the form of sensitive spot tests could not be developed in non porous media; filter paper was thus chosen.

Summary

The autoxidation of solutions containing cobaltous and excess azide ions is considerably accelerated by minute amounts of sulfites. Experimental evidence supports the view that the autoxidation of sulfurous acid induces the oxidation of cobalt from the divalent to the tervalent state. A spot test for the detection of sulfites has been developed on the basis of this phenomenon. The test is performed on filter paper. Limit of identification: 0.5 μg $NaHSO_3$. Dilution limit: 1 : 100000. Large amounts of thiosulfate ions inhibit the test but can be easily removed.

Zusammenfassung

Die Autoxydation von Kobalt(II)-lösungen, die überschüssige Azidionen enthalten, wird durch kleine Mengen Sulfit erheblich beschleunigt. Versuche deuten darauf hin, daß die Autoxydation der schwefeligen Säure die Oxydation des Co(II) zu Co(III) induziert. Auf dieser Grundlage wurde ein Tüpfelnachweis für Sulfit ausgearbeitet. Er wird auf Filterpapier ausgeführt. Erfassungsgrenze: 0,5 μg $NaHSO_3$; Grenzkonzentration: 1 : 100000. Große Mengen Thiosulfat stören den Nachweis, können aber leicht entfernt werden.

Résumé

L'autoxydation de solutions contenant des ions cobalteux et des ions azotures en excès est considérablement accélérée par des quantités de sulfites extrêmement faibles. L'hypothèse de l'induction de l'oxydation du cobalt de l'état divalent à l'état trivalent par l'autoxydation de l'acide sulfureux est confirmée par l'expérience. On a mis au point un essai à la touche pour la détection des sulfites sur la base de ce phénomène. L'essai est effectué sur papier filtre. Limite d'identification: 0,5 μg $NaHSO_3$. Limite de dilution: 1 : 100000. La réaction est inhibée par la présence d'ions thiosulfates en quantités importantes, mais ces ions sont faciles à éliminer.

Literature

[1] *P. Senise,* unpublished studies.
[2] *F. Feigl,* Spot tests, Vol. I, 4th ed. Amsterdam: Elsevier. 1954. p. 285.
[3] *F. Feigl,* Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. New York: Academic Press. 1949. p. 135.
[4] *F. Feigl* and *E. Fränkel,* Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 545 (1932).

Chemistry Department, The University, Glasgow

Molecular Weight Determination on a Hot-Stage Microscope

By

David T. Gibson and **John Currie**

With 1 Figure

(Received January 28, 1957)

Kofler[1] suggested that molecular weights might be determined on a hot-stage microscope, but the technique sketched in his posthumous book is not very elegant and some of his solvents have obvious disadvantages. *Pirsch*[2] considered that molecules which are approximately spherical will have high molecular depression constants. A survey of such compounds shows that many of them have also a high vapour pressure and are waxy solids – characteristics which make thorough quantitative mixing difficult.

We chose exaltone (cyclopentadecalone) from *Kofler*'s list of solvents as it is commercially available, and melts at a temperature (65°) at which it can be studied comfortably on a hot stage. No data for its depression constant could be traced in the literature. The following table shows the range of its solvent power and gives an average value of 190 ± 5 for the depression constant. Chloranil, Quinone, Limonin and Benzil were incompletely soluble.

	K
Cyclohexanone	183.8
2,2,6,6 Tetramethylcyclohexanone	182.0
Di-isopropyl-ketone	181.4
Naphthalene	195.5
Camphor	190.0
Azobenzene	188.4
Cholesterol	192.1
Δ^4 Cholestene-3-one	189.1
Enol Acetate of Δ^4 Cholestene-3-one	191.0
Cholesterol Myristate	184.1
Caryophyllene Oxide	189.3
Caryophyllene Chloride	190.2

	K
o-Toluic Acid	205.0
Tristearin	190.0
α Amyrone $C_{30}H_{48}O$	187.0
Iso-lanostene $C_{30}H_{50}$	194.0

We recommend weighing out the solute (0.5 mg) into a thin weighed tapering melting point tube, adding exaltone (15 mg), sealing the tube to 3 cm length, and inserting it into a short length of brass tubing heated about 20° above the melting point of exaltone. The brass and glass tubes are spun for a few minutes in a hand centrifuge, taken out and reversed and spun again. After three or four reversals the solution is homogeneous and no loss of solvent is possible. The glass tube is now

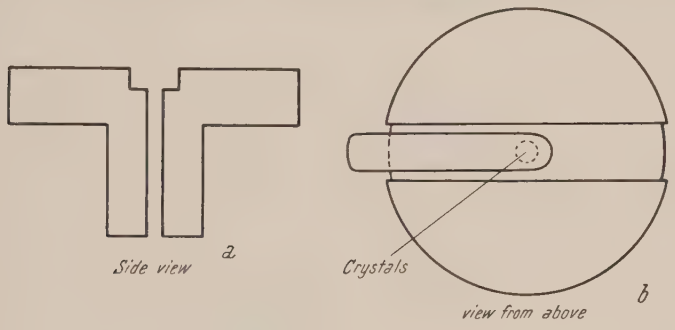


Fig. 1

placed in a brass "mushroom" (Fig. 1) which fits into the hot stage and is observed in polarised light. The solid appears golden yellow. The simultaneous disappearance of shape and colour facilitate the determination of the melting point. Moreover, it is easy to detect insoluble or incompletely soluble substances which would give rise to misleading values. We used an Anschütz type thermometer graduated to $^1/_5°$ so that our results cannot be accurate to more than 5%. Other solvents which we considered were monofluoro-pentachloroethane (K = 420)[3] and tetramethyl-thiomethane (K = 380)[4]. The former was so inordinately volatile that it distilled away from the solute. The latter showed no colour in polarised light and was so difficult to observe at the melting point that we did not investigate it further. In view of the wide use of camphor as a solvent in the ordinary Rast technique, we feel that santenone (m. p. 57°) would be a suitable solvent if it were more easily obtainable.

We are greatly indebted to Messrs. National Smelting Co. Ltd., for a supply of monofluoro-pentachloroethane; to Miss *Voss* of Groningen for a sample of tetramethyl-thiomethane and to Messrs. Stafford Allen & Co. for helping in our search for santenone.

Summary

Exaltone (M. P. 65°, K = 190 ± 5) is a suitable solvent for molecular weight determination on a hot stage microscope in polarised light. A homogeneous solution may be obtained by centrifuging the molten solvent solute backwards and forwards in the sealed tube in which the depression is subsequently observed.

Zusammenfassung

Exalton (Fp. 65°, K = 190 ± 5) eignet sich als Lösungsmittel für die Molekulargewichtsbestimmung am Heiztischmikroskop im polarisierten Licht. Man erhält eine homogene Lösung, indem man das geschmolzene Lösungsmittel mit der Substanz in einem geschlossenen Röhrchen hin- und herzentrifugiert. Dann bestimmt man die Depression.

Résumé

L'exaltone (F = 65°, K = 190 ± 5) est un solvant approprié à la détermination des masses moléculaires sur platine chauffante de microscope en lumière polarisée. On peut obtenir une solution homogène en centrifugeant après fusion solvant et corps dissous de l'une à l'autre extrémité du tube scellé dans lequel est effectuée la mesure de l'abaissement du point de fusion.

References

[1] *L. Kofler* und *A. Kofler*, Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Weinheim: Verlag Chemie. 1954.

[2] *J. Pirsch*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1839 (1932).

[3] *J. Bernstein* and *W. T. Miller*, J. Amer. Chem. Soc. **62**, 948 (1940).

[4] *H. J. Backer* and *W. G. Perdok*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **62**, 533 (1943).

Contribution from the Engineering Research Institute, and the Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Kyoto, Japan

Determination of Oxygen in Titanium by the Micro Bromination Method

By

Mitsunao Takahashi, Makoto Kawane and **Tetsuo Mitsui**

With 11 Figures

(Received January 28, 1957)

The determination of oxygen in titanium is a problem that has caused considerable discussions and researches. In the past oxygen in titanium has been commonly determined by the vacuum fusion method[1–7]. However the method requires an expensive apparatus and skill in operation. On the other hand, in the chlorination method[2,8,9,10] titanium and metallic impurities are converted into volatile chlorides by reaction with chlorine at 400° C, the chlorides are swept with over the chlorine gas, and are then condensed. Finally, the oxide residue is recovered and analysed. A correction must be made for carbon when the sample contains it, and the chlorination must be carefully controlled to prevent attack of the chlorine on the oxide with the production of gaseous oxygen. When the sample contains molybdenum, tungsten or vanadium, some oxygen may be lost as oxychloride. Instead of chlorine gas, dry hydrogen chloride gas can be used.

Since *Codell* and *Norwitz*[14] recently published a macro bromination method, the authors have attemped to apply the method, but the results obtained were not precise enough. A modified micro method has therefore been investigated.

I. The Micro Bromination Method

Oxygen in titanium is determined by a reaction which has been used[12,13] for the preparation of titanium tetrabromide, by heating a mixture of titanium dioxide and carbon together with bromine.

$$TiO_2 + 2\,C + 2\,Br_2 \rightarrow TiBr_4 + 2\,CO.$$

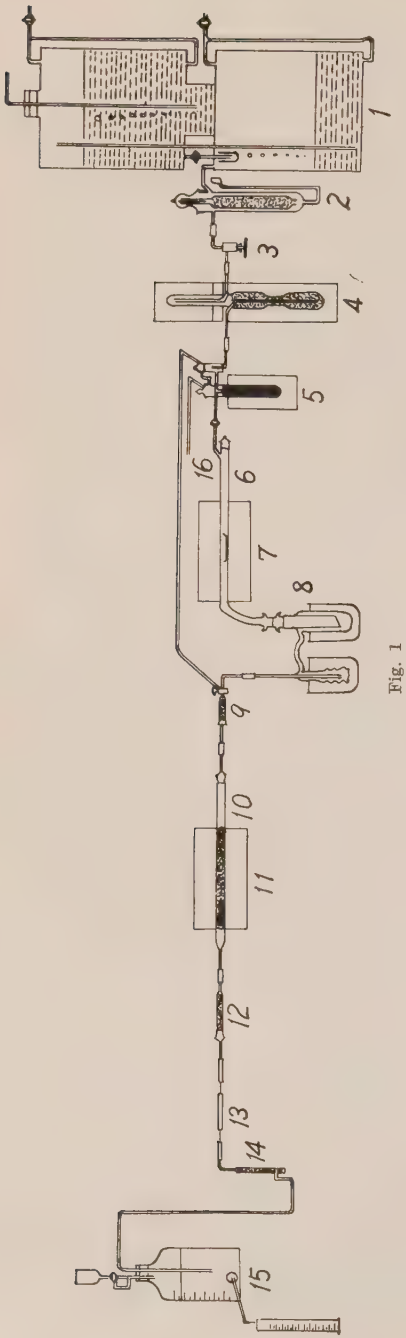


Fig. 1

The sample is mixed with carbon in a quartz boat and the mixture is treated with bromine in a quartz tube at 825° C, while argon is passed through the system. The resulting carbon monoxide is oxidized to carbon dioxide by copper oxide gauze maintained at 650° C, and the carbon dioxide is passed into a weighed absorption tube containing soda-asbestos. The titanium tetrabromide and excess of bromine are frozen out by means of a cold trap which is cooled with dry ice and alcohol. To remove the last traces of bromine and bromine compounds, a soda tube and silver-gauze (650° C) are used. An anhydrone tube is connected to the oxidation tube to retain water produced by oxidation of hydrogen in the sample.

II. Apparatus

The assembled apparatus is shown in Fig. 1. The numeral *1* indicates a gas-holder, *2* is a flow-meter, *3* is a needle valve made of stainless steel, *4* is a pre-heater with an absorber, *5* is a bromine vessel, *6* is a reaction tube of quartz, *7* is a reaction furnace[15], *8* is a cold trap, *9* is a soda tube, *10* is an oxidation tube, *11* is an oxidation furnace, *12* is an anhydrone tube, *13* is a carbon dioxide absorption tube, *14* is a guard tube, and *15* is a Mariotte bottle with a tap-funnel.

The apparatus is the same as that for carbon, hydrogen or nitrogen microdetermination designed by *Mitsui*[15–18] apart from the bromine vessel, reaction tube, cold trap, soda tube and oxidation tube.

Argon purifying train (Fig. 2)

The argon gas holder[15] (*1*) is constructed with two 10 litre copper com-

partments. The upper is completely closed and is filled with water, which displaces the argon in the lower compartment. The upper and lower compartments are connected by two tubes *c* and *d*. The gas pressure (*H*) in the

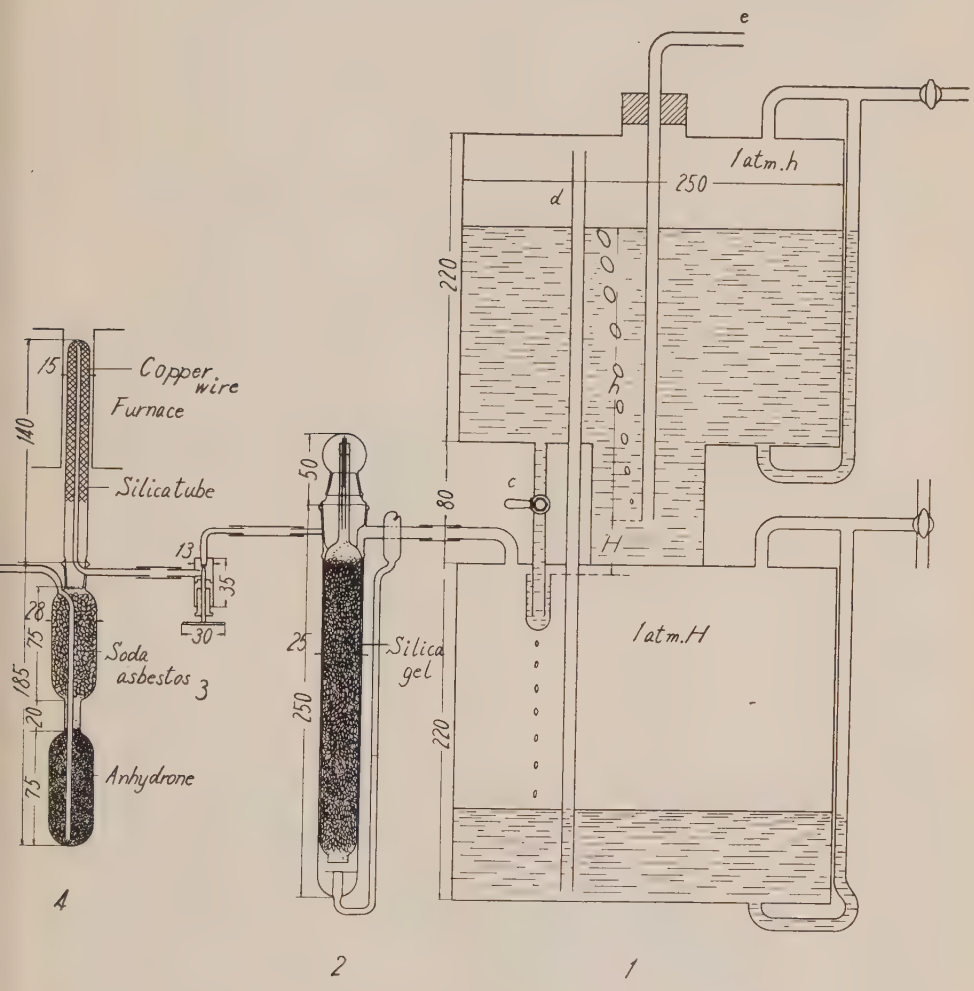


Fig. 2

lower compartment can be regulated by adjusting the height of the tube *e*. The flow-meter[16] (*2*) is constructed from a drying tube filled with silica gel and has an argon pressure gauge attached. The needle valve (*3*)[17] is made of stainless steel. The pre-heater[16] of silica tubing (*4*) is filled with copper wire (0.1 mm diameter) and is maintained at 550–600° C. The glass bulb is filled with soda-asbestos and anhydrone.

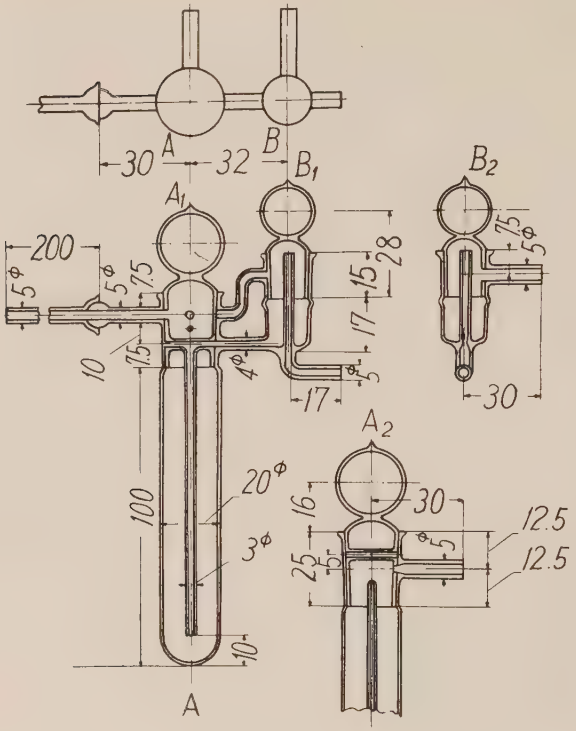

A
B
30
32
B_1
A_1
B_2
200
5φ
5φ
7.5
10
7.5
4φ
5
17
15
28
17
7.5
5φ
30
A_2
20φ
3φ
100
16
30
12.5
12.5
25
5
5
10
A

Fig. 3

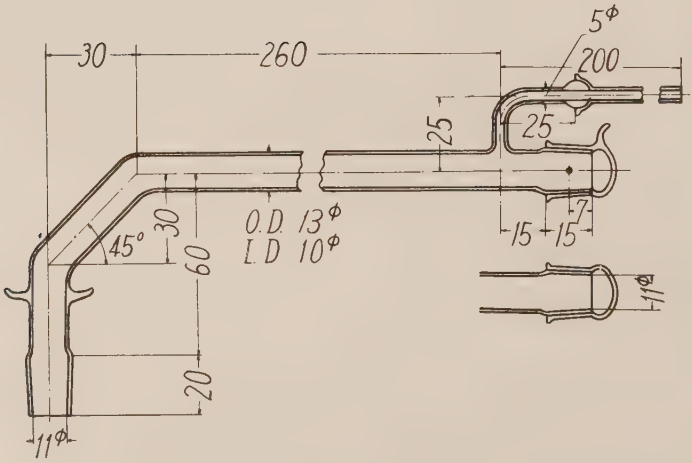

30
260
5φ
200
25
25
30
45°
60
O.D. 13φ
I.D. 10φ
15
15
7
11φ
20
11φ

Fig. 4

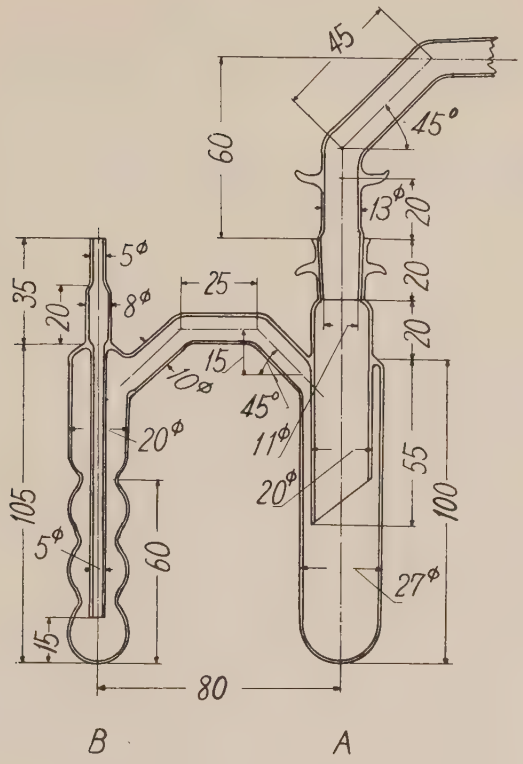

45
45°
60
13φ
20
20
20
5φ
35
20
8φ
25
15
10φ
45°
20φ
11φ
20φ
55
100
105
5φ
60
27φ
15
80
B
A

Fig. 5

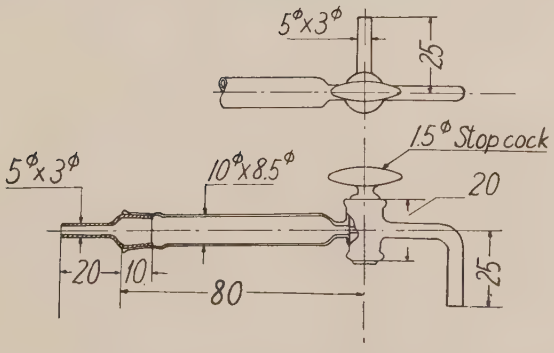

5φx3φ
25
15φ Stop cock
5φx3φ
10φx8.5φ
20
20
10
80
25

Fig. 6

Bromine vessel

The bromine vessel is shown in Fig. 3. When the stopcocks A and B are placed as shown in A_1 and B_1, the argon and bromine flow into the

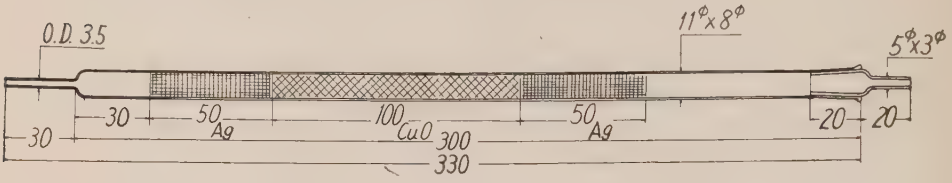


Fig. 7

reaction tube. When the stopcock A is turned to a right angle from A_1, only the argon flows into the reaction tube. When the vessel is charged with bromine, stopcock A is reversed to A_1, so that the air in the bromine vessel can be swept out. When stopcock A is closed and B is turned to B_2, argon is introduced through stopcock *9* (in Fig. 1) into the cold trap. The graduated bromine vessel is maintained at $58 \pm 1°$ C by an aluminium mortar. All stopcocks should be lubricated with perfluorocarbon grease.

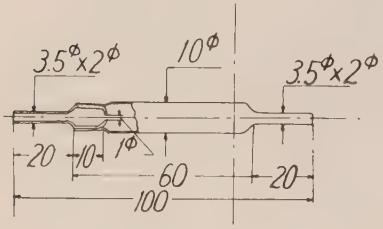


Fig. 8

Reaction tube

The reaction tube of quartz is shown in Fig. 4. The quartz boat introduced into the tube is 80 mm long, 8 mm wide and 5 mm high.

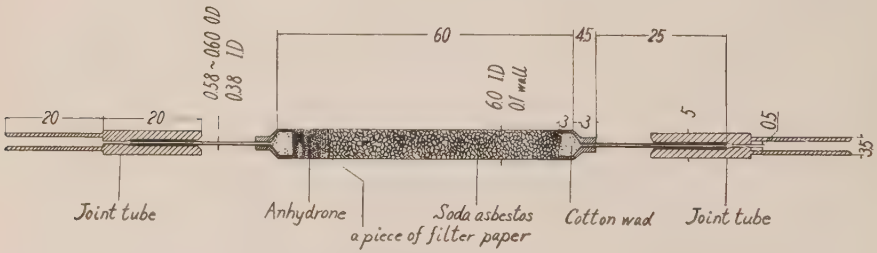


Fig. 9

Cold trap

A cold trap of Pyrex glass is shown in Fig. 5. Titanium tetrabromide and unused bromine can be frozen out in the trap. Tube A and tube B are cooled by dry ice-water and dry ice-ethanol (— 70° C).

Soda tube

A soda tube (Fig. 6) filled with soda-asbestos is used to retain the residue of bromine or bromine compounds.

Oxidation tube

An oxidation tube of quartz (Fig. 7) contains silver-gauze and copper oxide-gauze, and the tube is maintained at 650–720° C during the analysis. The last traces of bromine and bromine compounds are absorbed by the hot silver gauze and carbon monoxide is oxidized to carbon dioxide by the copper oxide.

Anhydrone tube

An anhydrone tube (Fig. 8) is connected to the end of the oxidation tube to remove water produced by oxidation of hydrogen in the sample.

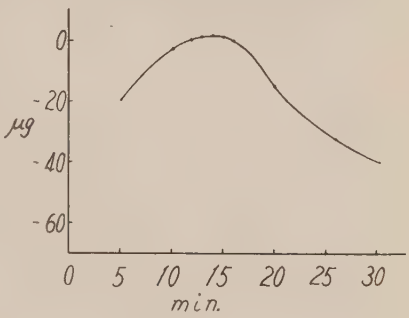


Fig. 10

Carbon dioxide absorption tube[18]

As shown in Fig. 9, the metal needle absorption tube, which is almost completely filled with soda-asbestos and a small amount of anhydrone, is used. This type of tube has several advantages over those of *Pregl*'s design in accuracy, ease of handling and no necessity for wiping before weighing. The tube is connected to the train by a "*Teflon*" joint. The relation between weight variation and time after the tube has been detached from the train is shown in Fig. 10. The experimental results show that fifteen minutes of waiting time is required before weighing.

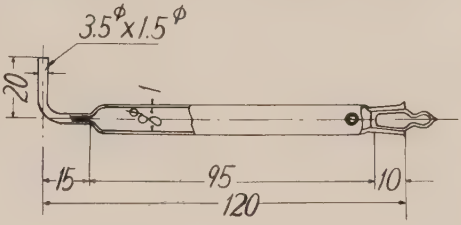


Fig. 11

Aspirating system

A guard tube (Fig. 11) filled with anhydrone is inserted between the carbon dioxide absorption tube and the Mariotte bottle (2 l capacity). The bottle has a tap-funnel[16].

III. Reagents

Argon: Grade *A*, about 99.99 per cent purity.

Bromine: The highest grade bromine is treated with pure sulphuric acid and then distilled.

Graphite powder: Granulated (80 ~ 150 mesh). It contains about 0.05 per cent of ash.

Copper(II) oxide: Gauze form, prepared in the laboratory from the 100 mesh copper gauze.

Silver wire: Diameter 0.1 mm.

Anhydrone: G. Frederick Smith Chemical Company, USA.

Soda-asbestos: Granulated (10 ~ 40 mesh).

Perfluorocarbon grease: The Osaka Kinzoku Company, Japan.

Silicone grease: Dow Corning Company, USA.

IV. Procedure

The train is set up as shown in Fig. 1 except for the carbon dioxide absorption tube. All electric furnaces are switched on except that for the reaction tube. The sample is prepared in the form of chips or strips about 0.5–1.0 mm thick. It is washed with carbon tetrachloride and dried throughly at 40–50° C. 1 g of the sample and 0.8 g of graphite powder are weighed out. About one half of the graphite powder is spread on the bottom of the boat, the sample is placed on this graphite, and is then covered with the rest of graphite. The boat is pushed into the centre of the furnace with the aid of a wire hook, the air in the reaction tube is replaced completely by argon, and the furnace is switched on. When the temperature reaches 825° C, the flow-rate of argon is adjusted to 8 ml per minute, the carbon dioxide absorption tube is connected to the train, and argon is allowed to pass through the system for 10 minutes. The tube is then disconnected and weighed. The absorption tube is connected again, and the stopcock is turned so that bromine and argon flow through the system. The temperature of the bromine vessel and the guide tube are maintained at $58 \pm 1°$ C and 60–70° C respectively. The fog in the vertical portion of the reaction tube disappears when the reaction is completed. The flow of bromine is continued for 5 minutes after the reaction ends. The flow of the bromine is then stopped and the furnace of the reaction tube is switched off, but the argon is allowed to flow for 30 minutes subsequently. Finally, the absorption tube is detached from the train and weighed.

Calculation

$$\text{O (per cent)} = \frac{36.36\,(W - B\,T)}{M}.$$

where, W = Weight of carbon dioxide, B = Blank value per hour, T = Time for a run, hours, M = Weight of the sample.

V. Notes on the Method

1. The blank value: The average blank value was found to be 0.1 mg of carbon dioxide per hour, when a quartz boat was used.

2. Conditioning: When the reaction tube and the cold trap are renewed, argon and bromine must be passed into the reaction tube at 825° C for an hour before an analysis.

3. Time required: The time which is required for an analysis of 1 g of the sample is as follows:

Introducing a sample into the reaction tube, and rising the temperature	30 minutes
First weighing of the absorption tube	15 minutes
Reaction	60 minutes
Flushing	30 minutes
Second weighing of the absorption tube	15 minutes
Total...	150 minutes

VI. Results Obtained

The results obtained for oxygen in two samples of commercially pure titanium are shown in Table I. The samples of rods (3 mm diameter) and of plates (0.6 × 20 × 50 mm) were prepared by Kobe Steel Company, and the oxygen content of the samples were determined by the vacuum fusion method using the apparatus of National Research Cooperation (USA.) in the laboratory of Kobe Steel Company.

Table I

Sample	Oxygen present (vacuum fusion method) %	Oxygen found (proposed method) %
Titanium rod, diameter: 3 mm	0.152	0.156
	0.157	0.157
	0.178	0.166
	0.166	0.163
		0.160
		0.165
		0.153
		0.161
		0.159
Mean value	0.163	0.160
Mean deviation		0.003
Mean deviation %		1.9
Titanium plate 0.6 × 20 × 50 mm	0.062	0.067
	0.066	0.066
	0.064	0.062
		0.073
		0.074
		0.068
		0.067
		0.068
		0.059
Mean value	0.064	0.067
Mean deviation		0.003
Mean deviation %		4.5

The results obtained by the proposed method check well with the results by the vacuum fusion method.

Acknowledgement

The authors are indebted to *Zenichiro Takao,* research director of Kobe Steel Company, for offering titanium samples, Shimadzu Seisakusho Company for constructing the apparatus for this experiment and *Tadashi Yagi* and *Tsuneo Yoshida* for testing the method in the laboratory.

Summary

A new micro bromination method is proposed for the determination of oxygen in titanium. The sample is mixed with carbon and treated with bromine at 825° C in a quartz boat, using argon as a carrier gas. The oxygen in the sample combines with the carbon to form carbon monoxide, which is then oxidized to carbon dioxide with hot copper oxide. The carbon dioxide is absorbed by a weighed absorption tube containing soda-asbestos. The bromine and titanium tetrabromide are removed by a cold trap cooled by dry ice and alcohol. To remove the last traces of bromine or bromine compounds, a soda tube and silver-gauze heated to 650° are used. The method has been satisfactorily applied to the determination of oxygen in commercial titanium.

Zusammenfassung

Eine neue Mikromethode zur Bestimmung von Sauerstoff in Titan durch Bromierung wird vorgeschlagen. Die Probe wird mit Kohlenstoff gemischt und bei 825° C in einem Quarzschiffchen mit Brom behandelt, wobei Argon als Trägergas dient. Der in der Probe enthaltene Sauerstoff reagiert mit dem Kohlenstoff zu Kohlenmonoxyd, das dann über erhitztem Kupferoxyd zu Kohlendioxyd oxydiert wird. Dieses wird in einem gewogenen Absorptionsröhrchen an Natronasbest gebunden. Brom und Titantetrabromid werden in einer Falle mit Trockeneis und Alkohol ausgefroren. Zur Entfernung der letzten Spuren Brom oder Bromverbindungen dient ein auf 650° erhitztes Röhrchen mit Natron und Silberdrahtnetz. Das Verfahren hat sich zur Bestimmung von Sauerstoff in handelsüblichem Titan zufriedenstellend bewährt.

Résumé

Les auteurs proposent une nouvelle microméthode de bromuration pour le dosage de l'oxygène dans le titane. L'échantillon mélangé avec du carbone est traité par le brome à 825° C dans une nacelle de quartz sous courant d'argon utilisé comme gaz de transport. L'oxygène de l'échantillon se combine au carbone sous forme d'oxyde de carbone qui est oxydé en anhydride carbonique sur oxyde de cuivre à chaud. L'anhydride carbonique est absorbé et pesé dans un tube absorbeur rempli d'amiante sodé. Le brome et le tétrabromure de titane sont retenus dans un piège refroidi par le système glace carbonique-alcool. Les dernières traces de brome et de composés bromés sont éliminées à l'aide d'un tube à soude et d'une toile d'argent chauffée à 650°. La méthode a été appliquée avec succès au dosage de l'oxygène dans le titane commercial.

References

[1] *W. M. Albrecht* and *M. W. Mallett*, Analyt. Chemistry **26**, 401 (1954).
[2] Armour Research Foundation, Illinois Institute of Technology, Chicago III, "Proceedings of Symposium on Analysis and Metallography of Titanium". June (1951).
[3] *G. Derge*, J. Metals **1** (No. 10), **31** (1949).
[4] *H. A. Sloman*, *C. A. Harvy* and *O. Kubaschewski*, J. Inst. Metals **80**, 391 (1951/52).
[5] Titanium Metals Corp. of America, New York, N. Y. "Handbook on Titanium metals" (1952).
[6] *D. I. Walter*, Analyt. Chemistry **22**, 297 (1950).
[7] *R. A. Yeaton*, Vacuum **2**, 115 (1952).
[8] *J. A. Corbett*, Analyst **76**, 652 (1951).
[9] *J. A. Corbett*, Metallurgia **49**, 206 (1954).
[10] *H. Goto*, *S. Suzuki* and *A. Onuma*, J. Japan Inst. Metals **19**, 89 (1955).
[11] *W. C. Lilliendahl*, *D. M. Wroughton* and *E. D. Gregory*, J. Electrochem. Soc. **93**, 235, 358 (1948).
[12] *G. P. Baxter* and *A. Q. Butler*, J. Amer. Chem. Soc. **50**, 408 (1928).
[13] *J. C. Olsen* and *E. P. Ryan*, J. Amer. Chem. Soc. **54**, 2215 (1932).
[14] *M. Codell* and *G. Norwitz*, Analyt. Chemistry **27**, 1083 (1955).
[15] *T. Mitsui*, Kagakuno Ryoiki **5**, 687 (1951).
[16] *T. Mitsui*, Bull. Res. Inst. Food Science, Kyoto University **17**, 20 (1955).
[17] *T. Mitsui*, Bull. Res. Inst. Food Science, Kyoto University **11**, 24 (1953).
[18] *T. Mitsui*, Bull. Res. Inst. Food Science, Kyoto University **12**, 39 (1953).

Central Analytical Laboratory, N. V. Onderzoekingsinstituut "Research" (AKU and affiliated companies), Arnhem, Netherlands

Description of a New Type of Parr Bomb

By

M. J. Maurice and **J. W. Y. Heynis**

With 1 Figure

(Received February 4, 1957)

Introduction

In the determination of total sulphur in rayon yarn, it is impossible to destroy the yarn by heating with acid, since small amounts of sulphide and xanthate, present in the yarn, escape determination by volatilization as hydrogen sulphide and carbon disulphide. Destruction with alkaline hydrogen peroxide proved to be very time consuming. Thus, it was decided to destroy the yarn with sodium peroxide in a Parr bomb. Because of the low content of sulphur compounds and in order to avoid the occurrence of sample inhomogeneity, at least 1 g of yarn had to be destroyed. At that moment we had a commercially available semi-micro type of Parr bomb at our disposal. In this bomb 1 g of yarn could be destroyed with at most 6 g of sodium peroxide (85%). This amount of sodium peroxide was insufficient for the complete destruction. Moreover, the gasket of the bomb was such that during the destruction some substance was forced out of the bomb. Therefore, another type of macro bomb was constructed, which had not the disadvantages of the former bomb.

Description of the Bomb

The bomb and its components are shown in Fig. 1. The packing consists of an O-ring of aluminium, that just fits the flange of the bomb. On this ring the lid is placed, and is tightened on the bomb with the aid of a bayonet-catch and a pressure screw. The bomb is so large, that when 1 g of yarn is destroyed with 10 g of sodium peroxide (85%), the melt touches neither the aluminium ring nor the lid. During the destruction no material is lost and the destruction proves to be complete.

The bomb was constructed from 18–8 chromium-nickel steel. This proved to be attacked when the melt was dissolved. Therefore, the bomb was provided with a coating of nickel. This coating completely prevented the attack by the alkaline solution.

The bomb was used for the destruction of rayon yarn. Rubber can also be destroyed in it and several organic compounds.

The advantages of this type of bomb are: (a) no leakage and (b) the possibility of destroying a fairly large amount of material, which is of special importance, when the amount of the component to be determined, contained in it, is very small.

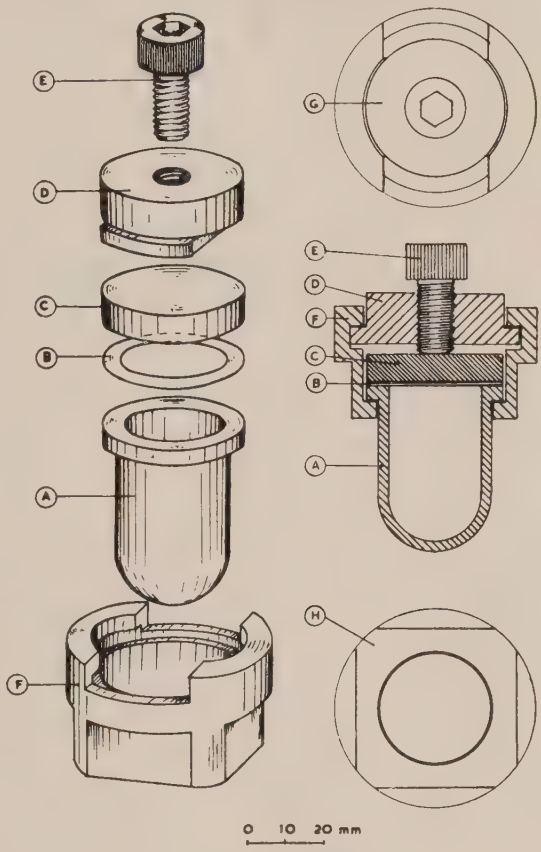


Fig. 1. Parr Bomb and Components
A nickel coated, 2.5-mm stainless steel bomb. *B* 0.2-mm aluminium gasket ring. *C* nickel coated, 8-mm stainless steel lid. *D* stainless steel tightening plate. *E* screw. *F* stainless steel bayonet coupling. *G* top view of assembled apparatus. *H* bottom view of assembled apparatus

Recommended Procedure

Place in the bomb *A* 5 g of sodium peroxide (85%), add an amount of the sample that will be quantitatively destroyed by 10 g of sodium peroxide and add 5 more grams of sodium peroxide. Place the bomb *A* in the bayonet coupling *F*, fit it with the ring *B* and the lid *C*. Close the bomb with the tightening plate *D* and the screw *E* and heat for 4 minutes at most on a small flame of 1 cm height. Cool for a few minutes, immerse the bomb in cold water for a few seconds and allow to cool further to about 50–60° C. Loosen the screw *E*, remove the plate *D*, the lid *C* and the ring *B* and carefully rinse the contents with water into a 400-ml beaker. After removal of the hydrogen peroxide, carry out the desired determination in this solution.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Natuurkundig Laboratorium of Philips' Gloeilampenfabrieken N. V. at Eindhoven for having nickelplated the bomb and the management of the N. V. Onderzoekingsinstituut "Research" for permission to publish this paper.

Summary

A type of macro-Parr-Bomb is described and a procedure for the destruction of the substance is given.

Zusammenfassung

Ein Typ einer Makro-Parr-Bombe wird beschrieben und eine Vorschrift für die Zerstörung der Substanz wird gegeben.

Résumé

Un type de macro-Parr-Bombe est décrit et une instruction pour la destruction de la substance est proposée.

Central Analytical Laboratory, N. V. Onderzoekingsinstituut "Research" (AKU and affiliated companies), Arnhem, Netherlands

The U. V. Spectrophotometric Determination of Potassium Ethylxanthate*

By

M. J. Maurice and **J. L. Mulder**

With 2 Figures

(Received February 4, 1957)

Introduction

Some years ago *Schauenstein* and *Treiber*[1] determined the molar absorptivity of several xanthates in different solvents in order to have a method for the determination of xanthates. These authors found the molar absorptivity of xanthates to be practically independent of the alkyl groups and the solvents in which the xanthates were dissolved, and conclude that this property of all xanthates is the same in different solvents. As the average for this molar absorptivity they record $\overline{K} = 14790$, i. e. $\log \overline{K} = 4.17$ as measured photographically with a U. V. spectrograph.

In a previous study[2] it was established by potentiometric titration of potassium ethylxanthate, prepared from known amounts of carbon disulphide, with copper(II) acetate, that the reaction of carbon disulphide with ethanolic potassium hydroxide is rapid and quantitative. However, when the molar absorptivity value of 14790 was applied to the determination of these potassium ethylxanthate solutions too high results were obtained. Therefore, it was decided to investigate further the U. V. spectrophotometric method as described by *Schauenstein* and *Treiber*[1].

---

* Part of the thesis of the first author, Dissertation Free University, Amsterdam, 1956.

The Spectra of Potassium Ethylxanthate

A standard solution of potassium ethylxanthate was prepared by weighing about 800 mg of pure carbon disulphide to the nearest 0.1 mg into a sealed thinwalled glass tube and placing the tube in a solution of 0.1 *N* ethanolic potassium hydroxide. The tube was broken by shaking the flask and the volume made up to 100 ml with 0.1 *N* ethanolic potassium hydroxide. This standard solution was diluted using different solvents. The U. V. absorption spectra of potassium ethylxanthate dissolved in 96% ethanol and in 0.02 *N* sodium hydroxide are shown in Fig. 1.

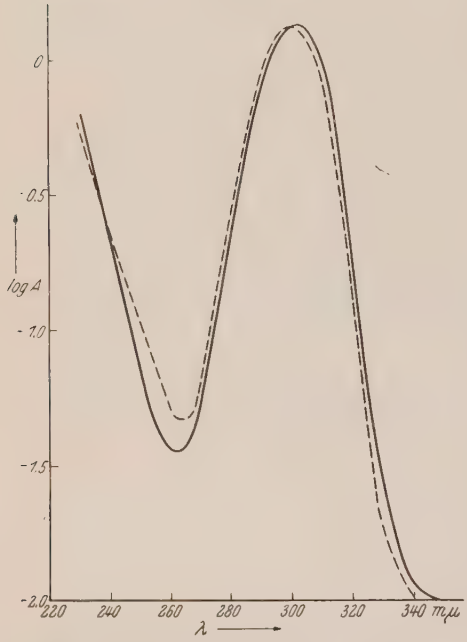


Fig. 1. U. V. absorption spectra of potassium ethylxanthate dissolved in 96% ethanol ———, 0.02 N NaOH - - - - - - -

These spectra were also determined when potassium ethylxanthate was dissolved in 50% ethanol and in 0.05 *N* potassium hydroxide in 50% ethanol. The wavelengths, where–in these solvents–maximum absorptivity occurs proved to be dependent on the nature of the solvent, as is shown in Table I.

Stability of the Xanthate Solutions

The standard solution could be kept unchanged for at least four days. This was established by diluting the standard solution every day to a concentration of about 5 μg of carbon disulphide per ml and following

Table I

Solvent	Max.
96% ethanol	304 mμ
50% ethanol	301.5 „
0.05 *N* KOH in 50% ethanol	301 „
0.02 *N* NaOH	301 „

the absorbance during several days. The xanthate solutions diluted with 96% ethanol, 50% ethanol or 0.02 *N* sodium hydroxide, and containing about 5 μg of carbon disulphide per ml were stable for one hour at most, which is illustrated in Table II.

Table II

Time \ Solvent	Absorbance: 96% ethanol	50% ethanol	0.02 N NaOH
0 minutes	1.190	1.195	1.142
5 „	1.190	1.195	1.142
10 „	1.190	1.195	1.142
20 „	1.190	1.195	1.142
30 „	1.190	1.195	1.142
60 „	1.184	1.192	1.140

Calibration Graph

After the determination of the spectra and the stability of the xanthate solutions, a calibration graph was established. A standard solution of potassium ethylxanthate in 0.1 *N* ethanolic potassium hydroxide, prepared in the way described above, was diluted with 96% ethanol to a concentration of 1 to 6 μg of carbon disulphide per ml. The absorbance of this solution was measured at a wavelength of 304 mμ against a blank of 96% ethanol, using a Unicam SP 500 spectrophotometer and 1-cm cells. The whole procedure including the preparation of the standard solution was repeated thirteen times. In this case the standard solutions were diluted so much that the diluted solutions were $5 \cdot 10^{-5}$ *N* in potassium hydroxide. The solutions measured were practically ethanolic solutions. The calibration graph, obtained by plotting the absorbances versus concentration, is shown in Fig. 2.

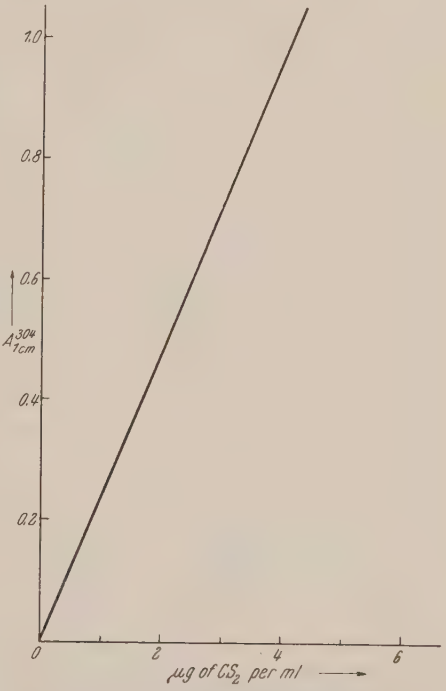


Fig. 2. Absorbance of potassium ethylxanthate in 96% ethanol at 304 mμ as a function of the concentration

The relationship between absorbances and concentration was supposed to be linear. Since the error in concentration is negligible compared with that in absorbance, this linear relationship can be estimated by computing the regression of absorbance on concentration by application of the method of least squares.

By application of the t-test, it was established that the intercept found did not significantly differ from zero. The intercept, therefore, was put zero. The equation found, is: $A = 0.2409\,C$, where A = absorbance at 304 mμ, C = concentration of carbon disulphide in μg per ml.

The correlation coefficient was 0.9999. It must be concluded that the *Lambert-Beer* law is followed and that it is possible to determine potassium ethylxanthate U. V. spectrophotometrically.

Molar Absorptivity

In the determination of an unknown concentration, apart from the calibration graph, use can be made of the molar absorptivity K from the equation: $K = \frac{MA}{C}$,

where M = molecular weight,

C = concentration of carbon disulphide in mg per ml,

A = absorbance.

Of course, a linear calibration graph is a prerequisite. K was calculated from the graph determined and is given in Table III. Moreover, the molar absorptivities of potassium ethylxanthate in different solvents were determined. Aliquots of the standard solution were diluted with 50% ethanol, 0.02 N sodium hydroxide or 0.05 N potassium hydroxide in 50% ethanol to concentrations of 1 to 6 μg of carbon disulphide per ml. From each solution the absorbance was measured at the wavelength where maximum absorptivity occurs. The results are shown in Table III, where $\bar{K}$ is the average K-value, calculated from n determinations, s_K is the standard deviation of an individual determination and $s_{\bar{K}}$ is the standard deviation of $\bar{K}$.

Table III

Solvent	$\bar{K}$	s_K	$s_{\bar{K}}$	n
96% ethanol	18310	68	18	14
50% ethanol	18330	95	39	6
0.02 N NaOH	17420	110	45	6
0.05 N KOH in 50% ethanol ...	17820	67	27	6

No significant differences can be detected between the s_K-values found, this being established by application of the F-test. These values are, therefore, considered to be estimates of the same universal standard deviation, and hence it is possible to compute from these values an estimate that is better because of the greater number of degrees of freedom involved. This value amounts to 81.

From Table III, it is seen, that no significant difference can be detected between the first two $\bar{K}$-values (for 96% and 50% ethanol). The other

two $\bar{K}$-values differ significantly between them and from the first pair of values. This means that the molar absorptivity of potassium ethylxanthate depends upon the nature of the solvent in which it is dissolved.

Precision of the Method

Though $\bar{K}$ is an estimate of K', the true value, the $\bar{K}$-value can still be used in establishing the precision of the method. From the equations $K' = \frac{MA}{C}$ and thus $C = \frac{MA}{K'}$, the variance of the spectrophotometrically determined concentration can be calculated. For the variance of this concentration, Var (C), is found:

$$\text{Var}\,(C) = \frac{M^2\,\text{Var}\,(A)}{K'^2} + \frac{C^2\,\text{Var}\,(K')}{K'^2}.$$

The variance of the absorbance measurement, Var (A), was calculated from the data found in establishing the calibration graph and found to be $26 \cdot 10^{-6}$. Var (K') is 900. When these values are substituted in the formula for Var (C) and for K' and M are substituted 18000 and 76 respectively, the following formula is obtained:

$$\text{Var}\,(C) = 464 \cdot 10^{-12} + 2.8 \cdot 10^{-6}\,C^2.$$

In this formula C is expressed in mg of carbon disulphide per ml. Since in the range of concentrations examined C ranges from 1 to 6 μg of carbon disulphide per ml, the second term of the formula is small compared with the first and may be neglected. The standard deviation of the spectrophotometrically determined concentration for the range examined amounts to $\sqrt{464 \cdot 10^{-12}}$ mg of carbon disulphide per ml, i. e. 0.022 μg per ml. This precision is to be considered very satisfactory.

Discussion

From the experimental results described above it follows that the wavelength where potassium ethylxanthate shows maximum absorptivity and the magnitude of the absorptivity at that wavelength both are a function of the nature of the solvent. This is not recorded explicitly by *Schauenstein* and *Treiber*[1], although the spectra shown in their communication suggest such an influence of the solvent. The influence of the solvent on the molar absorptivity may not be neglected: the difference between the maximum and minimum $\bar{K}$-value (Table III) is 5% of the maximum $\bar{K}$-value. This means that by application of an incorrect $\bar{K}$-value the determined amount of carbon disulphide will be 5% too high or too low, since this amount is proportional to K.

With the $\bar{K}$-value recorded by *Schauenstein* and *Treiber*, viz. 14790, we would find that the carbon disulphide used in the preparation of our standard solution has a content of 120%.

It must be concluded that this $\bar{K}$-value is not applicable to determinations, which are carried out with a Unicam SP 500 spectrophotometer or comparable instruments.

Recommended Procedure

The following procedure is applicable to the determination of 100 to 600 μg of carbon disulphide as potassium ethylxanthate, the usual form to which the compound is converted by passing it into a 0.1 N ethanolic potassium hydroxide solution.

Absorb the carbon disulphide to be determined in 50 ml of 0.1 N ethanolic potassium hydroxide solution. Dilute with water to 100 ml and measure the absorbance of this solution at a wavelength of 301 mμ against a blank prepared in the same way but with omission of the carbon disulphide absorption, using 1-cm cells (absorbance measured: A).

Determine the molar absorptivity as follows:

By means of a hypodermic syringe introduce about 500 mg of analytical grade carbon disulphide into a weighed 1-ml thin glass vial. Seal the stem in a small flame, and reweigh to the nearest 0.1 mg. Place the vial in a 100-ml volumetric flask, add 50 ml of 0.1 N ethanolic potassium hydroxide solution, shake vigorously to break the vial and make up to volume with the same solution. Dilute at least six aliquots of this stock solution with 0.05 N potassium hydroxide in 50% ethanol to concentrations of 1 to 6 μg of carbon disulphide per ml. Measure the respective absorbances of these solutions at a wavelength of 301 mμ against a blank of 0.05 N potassium hydroxide in 50% ethanol, using a U. V.-spectrophotometer and 1-cm cells (absorbances measured: $A_1, A_2, \ldots, A_6$).

Calculate for each of the solutions the molar absorptivity according to the formula:

$$K = \frac{1000\, M \cdot A_i}{C},$$

where M = molecular weight of carbon disulphide,
A_i = absorbance measured,
C = concentration of carbon disulphide in μg per ml.

Calculate the mean of these molar absorptivities as

$$\bar{K} = \frac{\Sigma K}{n},$$

where n = number of solutions measured.

The sample contains:

$$\frac{76 \cdot 10^5 A}{\bar{K}} = \mu g \text{ of carbon disulphide,}$$

where A = absorbance measured on sample solution,

$\bar{K}$ = mean molar absorptivity.

Report the results to the nearest μg; the maximum acceptable difference between random duplicates is 7 μg.

Acknowledgment

The authors are indebted to Prof. Dr. *E. van Dalen*, Free University, Amsterdam, for his valuable suggestions during this investigation and to the management of the N. V. Onderzoekingsinstituut "Research" for permission to publish this paper.

Summary

A U. V.-spectrophotometric determination of potassium ethylxanthate is described and a recommended procedure is given. The method may be used for the determination of small amounts of carbon disulphide.

Zusammenfassung

Es wird eine UV-spektrophotometrische Bestimmung von Kaliumäthylxanthogenat beschrieben und eine Arbeitsvorschrift empfohlen. Die Methode kann für die Bestimmung kleiner Mengen Schwefelkohlenstoff verwendet werden.

Résumé

Une méthode U. V.-spectrophotométrique pour le dosage de l'éthylxanthogénate de potassium est décrite et une instruction recommendée est proposée. La méthode peut être utilisée pour le dosage des petites quantités de sulfure de carbone.

References

[1] *E. Schauenstein* and *E. Treiber*, Melliand Text. Ber. **32**, 43 (1951).
[2] *M. J. Maurice*, Analyt. Chim. Acta **14**, 583 (1956).

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien
(Lehrkanzel für analytische Chemie)

Photometrische Bestimmung von Thorium mit Quercetin*

Von

E. Tomic und **H. Khalifa**

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1957)

Die geochemische Prospektion nach Thorium macht oft die Bestimmung von Thoriummengen der Größenordnung von 10^{-5} bis 10^{-6} g notwendig. Auf der Suche nach im Handel erhältlichen oder leicht darzustellenden Reagenzien, die empfindlich genug sind, eine photometrische Bestimmung in dem Konzentrationsbereich von $(0{,}1 \text{ bis } 1) \cdot 10^{-6}$ zu ermöglichen, erwiesen sich Indooxin[1] und Quercetin (5,7,3′,4′-Tetrahydroxyflavanol) geeignet. Quercetin hat gegenüber Indooxin noch den Vorteil, daß es eine Thoriumbestimmung in Gegenwart eines beträchtlichen Überschusses an Eisen, Uran und Seltenen Erden gestattet.

Apparatives

Für die Bestimmung von Th-Mengen von 1 bis 10 μg/10 ml verwendeten wir das Universalkolorimeter von B. Lange (Modell VI), woran das Lichtmarkengalvanometer der Firma Kipp en Zonen (Delft, Holland) geschaltet war. Es wurde mit 34-mm-Küvetten mit einem Volumen von etwa 5 ml gearbeitet. Die vorhandenen Interferenzfilter hatten ihre maximale Durchlässigkeit bei 460 mμ; Halbwertsbreite 10 mμ.

Die Bestimmungen von Th-Mengen von 2 bis 60 μg/10 ml wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer (Modell B) bei 430 mμ unter Verwendung von 1-cm-Küvetten ausgeführt.

Reagenzien und Lösungen

Th-Lösungen: Durch Lösen von spektralreinem $Th(NO_3)_4 \cdot 4\,H_2O$ in 0,01-n HNO_3 wurde eine Stammlösung bereitet, deren Gehalt durch

* Herrn Prof. Dr. *Friedrich Wessely* in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet.

Oxinatfällung nach *Hecht* und *Ehrmann*[2] sowie durch Komplexontitration nach *M. Malak* et al.[3] zu 3,22 mg/ml bestimmt wurde. Durch entsprechendes Verdünnen dieser Lösung mit 0,01-n HNO_3 wurde daraus eine Lösung mit 100 μg/ml hergestellt. Aus dieser Lösung wurden dann die Arbeitslösungen mit 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60 und 80 μg Th/ml wieder durch Verdünnen mit 0,01-n HNO_3 bereitet.

Quercetinlösungen: 0,1 und 0,01%ig; sie wurden durch Lösen der gewogenen Mengen Quercetin der Firma Th. Schuchardt, München, in reinem, frisch dest. Äthanol bereitet.

Salpetersäure p. a. (Merck), durch Verdünnen 0,01-n;

Natriumacetat-Essigsäurepuffer nach *Walpole*[4], $p_H = 5{,}6$ (0,2-n HAc : 0,2-m NaAc $\simeq$ 1 : 9);

Tridestilliertes Wasser.

Einfluß des Puffers und des p_H

Citrat-, Phthalat- und Tartrat-Puffersysteme erwiesen sich als ungeeignet, was auf die Bildung relativ stabiler Komplexe dieser Anionen mit Thorium zurückzuführen sein dürfte. Bei Verwendung des Acetatpuffers ist bei einem p_H von 3,6 die Bildung einer gelbgefärbten Verbindung zu beobachten, deren Farbintensität mit steigendem p_H zunimmt, während bei der Leerwertbestimmung keine Farbe auftritt. Es wurde daher für die weiteren Untersuchungen der höchste, mit dem Acetatpuffer nach *Walpole* einzustellende p_H-Wert von 5,6 gewählt.

Absorptionsspektren

In Abb. 1 sind die Absorptionsspektren der Reagenslösung (Leerwert: Kurve *1*) und der mit Thorium versetzten Reagenslösung (Thorium-Quercetin-Verbindung: Kurve *2*) dargestellt. Als Ordinate auf der Abb. gilt der rechts befindliche Maßstab in Prozenten der Durchlässigkeit. Bei beiden Kurven wurde als Bezugslösung reines Wasser verwendet. Wird bei der Absorptionsmessung der Lösung der Thorium-Quercetin-Verbindung als Bezugslösung nicht Wasser, sondern die Reagenslösung verwendet, so weist diese Kurve Maxima an jenen Stellen auf, an denen die Differenzen der Durchlässigkeitswerte von Kurve *1* und *2* jeweils am größten sind. Da die erwähnten Differenzen im Vorzeichen wechseln, zeigt die ermittelte Differenzkurve (Kurve *3*) Durchlässigkeitswerte von unter und über 100%. Absorbiert nämlich die Reagenslösung (gemessen gegen Wasser) stärker als die Lösung der Thorium-Quercetin-Verbindung (ebenfalls gemessen gegen Wasser), so werden bei der Aufnahme der Absorptionskurve der Lösung der Thorium-Quercetin-Verbindung gegen die Reagenslösung Durchlässigkeitswerte von über 100% zu beobachten sein. Es ist für die Ermittlung dieser Kurve nötig, die 100% Durch-

lässigkeit in die Mitte des (in der Abb. links befindlichen) Ordinatenmaßstabes zu legen. Experimentell kann dies mit dem verwendeten registrierenden Spektrophotometer, Beckman, Modell DK 1* (einem Doppelstrahlgerät), leicht ausgeführt werden.

Die Abb. 1 läßt die Möglichkeit der Messung der Thorium-Quercetin-Verbindung im Bereich zwischen 425 und 450 mμ erkennen. Nach Kurve *3* ist optimal bei 430 mμ zu messen.

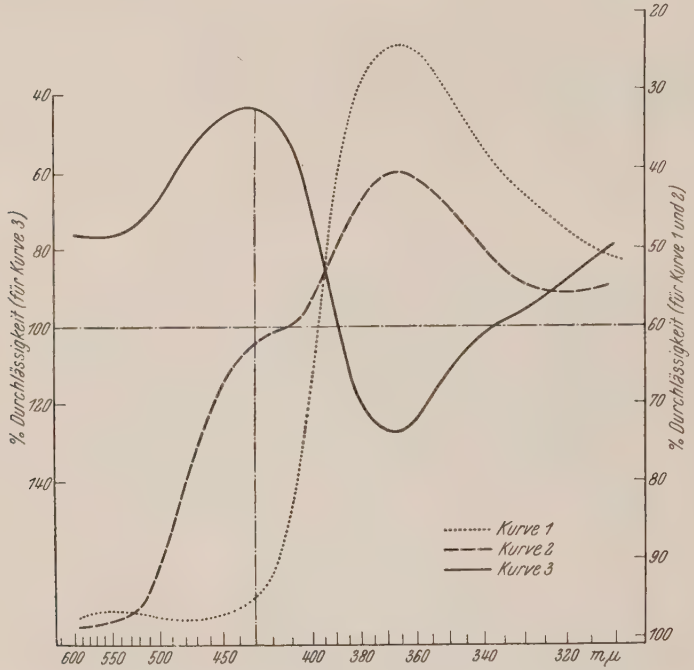


Abb. 1

Reihenfolge der Reagenzienzugabe und Empfindlichkeit der Methode

Bestandteile der Lösung:
1 ml der Th-Lösung mit 50 μg Th/ml;
0,5 ml 0,2-n Essigsäure
4,5 ml 0,2-m Natriumacetatlösung } $p_H = 5{,}6$.
3 ml der 0,1%igen Quercetinlösung.

Die obigen Reagenzien wurden systematisch in verschiedener Reihenfolge in einen 10-ml-Meßkolben gebracht und dieser mit tridestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Es wurde mit dem Beckman-Spektro-

* Für die leihweise Überlassung des Gerätes sind wir der Fa. Beckman, München, sowie deren Wiener Vertretung, Fa. Inula, zu Dank verpflichtet.

photometer (Modell B) gemessen. Die Untersuchung zeigte, daß die Reihenfolge der Reagenzienzugabe ohne Einfluß auf die gemessenen Extinktionswerte ist, es sei denn, daß die Th-Lösung zuerst mit Natriumacetatlösung versetzt wird, wobei Hydrolyse des Thoriumions eintritt. Bei den folgenden Versuchen wurde die Reihenfolge der Reagenzienzugabe: Th-Lösung/Quercetinlösung/Puffer (wobei die entsprechende Mischung der Essigsäure- und Natriumacetatlösungen verwendet wurde) eingehalten.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Methode wurde mit dem Lange-Kolorimeter gearbeitet. Bei Schaltung des angeschlossenen Kipp-en-Zonen-Galvanometers auf seine höchste Empfindlichkeit (Stufe 5) entspricht ein Photostrom von etwa $3 \cdot 10^{-10}$ Ampere einem der 200 Skalenteile. Das Gerät wurde so eingestellt, daß die 200 Skalenteile einer Absorption von 50% entsprachen. Unter diesen Bedingungen ist bei Verwendung der 34-mm-Küvetten noch 1 μg Th in 10 ml bequem bestimmbar (16 Skalenteile). Da aber die vorhandenen Interferenzfilter ihre maximale Durchlässigkeit bei 460 statt bei 430 mμ (Halbwertsbreite 10 mμ) hatten, wäre mit einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit zu rechnen, wenn Interferenzfilter von 430 mμ verwendet werden.

Wird das Beckman-Spektrophotometer Modell B (ohne Multiplierzusatz) verwendet, so lassen sich noch 2 μg Th/10 ml bestimmen, wenn man 1-cm-Küvetten verwendet.

Geschwindigkeit der Farbbildung und Stabilität der gefärbten Verbindung

Absorptionsmessungen mit dem Beckman B-Spektrophotometer für Lösungen mit verschiedenen Th-Konzentrationen zeigten, daß die Farbbildung mit Quercetin sofort mit voller Intensität erfolgt und über Stunden konstant bleibt. Das Reagens wurde bei den Messungen in Form von 3 ml einer 0,1%igen Lösung für Mengen über 10 μg Th/10 ml oder einer 0,01%igen Lösung für Th-Mengen unter 10 μg/10 ml zugesetzt. Wird die zur quantitativen Bildung der gefärbten Verbindung notwendige Reagensmenge in weniger als 3 ml Alkohol für ein Endvolumen von 10 ml angewendet, so tritt, insbesondere bei höheren Th-Konzentrationen, sehr bald eine Trübung der Lösung ein, weshalb immer mit einer Alkoholkonzentration von 30 Volumprozent gearbeitet wurde.

Erforderliche Reagensmenge

Die zur quantitativen Reaktion notwendige Reagensmenge wurde durch Absorptionsmessungen von Lösungen ermittelt, die 50 μg Th in 10 ml der zu messenden Lösung enthielten. Es wurden sodann zunehmende Mengen einer 0,05%igen Quercetinlösung zugesetzt, wobei die Alkoholkonzentration stets auf 3 ml/10 ml ergänzt wurde. Nach

Zusatz von 4 ml des Acetatpuffers ($p_H = 5{,}6$) wurde das Volumen mit Wasser auf 10 ml ergänzt. Die Messungen erfolgten mit dem Beckman B-Spektrophotometer.

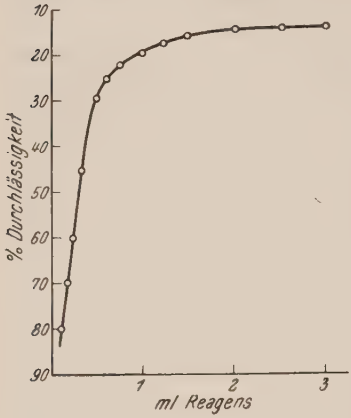


Abb. 2

Wie aus der Abb. 2 zu ersehen ist, erfolgt nach Zugabe von 1,5 ml der 0,05%igen Reagenslösung keine wesentliche Abnahme der Durchlässigkeit mehr. Für die Bestimmung von 1 bis 10 μg Th sind daher 3 ml einer 0,01%igen Reagenslösung bei weitem ausreichend.

Einfluß der Temperatur

Zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Absorption der Th-Quercetinverbindung wurden die Leerwertlösung sowie 10, 20 und 50 μg Th/10 ml enthaltende Lösungen auf 15, 20, 25 und 30° gebracht und die Absorption mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell B, gemessen.

Wie aus der Abb. 3 ersichtlich ist, sinkt die Absorption aller Lösungen zwischen 15 und 30° ab, wobei der Unterschied der gemessenen Werte zwischen 20 und 25° am größten und zwischen 15 und 20° am geringsten ist. Bei dem Versuch, die Temperatur über 30° zu steigern, trat Trübung der Lösungen auf. Es empfiehlt sich daher, im Temperaturbereich zwischen 15 und 20° zu messen.

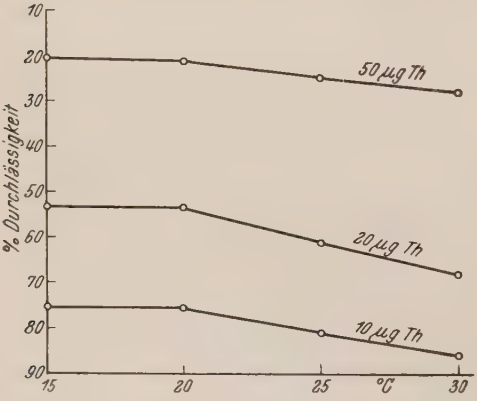


Abb. 3

Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes

a) Bereich zwischen 0,1 und 1 μg Th/ml.

Lösungen: 0 bis 10 μg Th in jeweils 2 ml einer 0,01-n HNO_3, 3 ml einer 0,01%igen Quercetinlösung in Äthanol, 5 ml Puffer ($p_H = 5{,}6$).

Die Messungen erfolgten mit dem Lange-Kolorimeter. In der Abb. 4 sind die Mittelwerte von jeweils zwei Parallelbestimmungen wiedergegeben.

b) Bereich zwischen 1 und 6 μg Th/ml.

Lösungen: 0 bzw. 10 bis 100 μg Th in jeweils 2 ml einer 0,01-n HNO_3, 3 ml einer 0,1%igen Quercetinlösung in Äthanol, 5 ml Puffer ($p_H = 5{,}6$).

Die Messungen erfolgten mit dem Beckman B-Instrument. In Abb. 5 sind die Mittelwerte von jeweils zwei Parallelbestimmungen wiedergegeben.

Unter den gegebenen Bedingungen ist also das Lambert-Beersche Gesetz im Bereich zwischen 0,1 und 6 μg Th/ml erfüllt.

Th-Konzentrationen über 12 μg/10 ml sind am Lange-Kolorimeter, solche über 60 μg/10 ml am Beckman B-Spektrophotometer nicht mehr unverdünnt meßbar, da die Absorption dieser Lösungen schon zu groß ist.

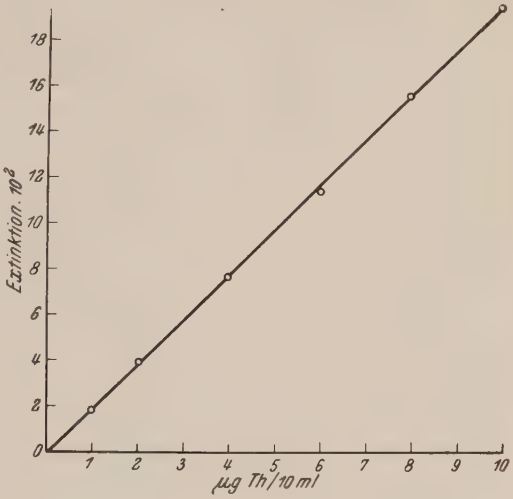


Abb. 4

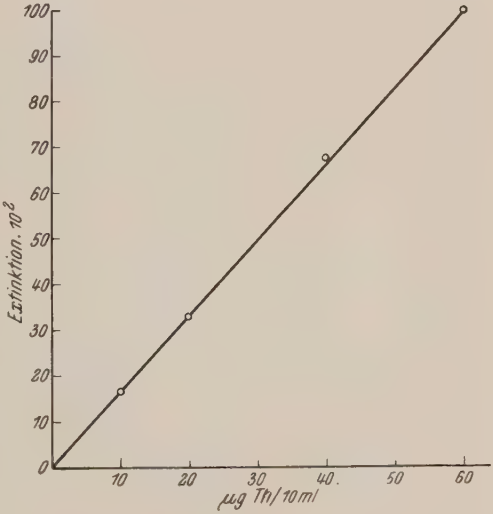


Abb. 5

Einfluß von Fremdionen

Wegen des geringen Gehaltes der meisten natürlichen Gesteine und Wässer an Thorium ist zu dessen genauer Bestimmung in jedem Falle eine vorhergehende Anreicherung bzw. Abtrennung notwendig, so daß in den meisten Fällen letzten Endes mehr oder weniger reine Thoriumlösungen zur Bestimmung benützt werden. Es konnten also von vornherein von den Kationen, die mit Quercetin reagieren, jene ausgeschieden werden, die nach einer Anreicherungsoperation, wie etwa einer Tributylphosphat- oder Ätherextraktion, Ionenaustausch usw., fast zur Gänze entfernt werden. Störungen sind

nach derartigen Operationen nur noch durch Eisen, Uran und die Seltenen Erden zu erwarten. Um den störenden Einfluß dieser Elemente auf die photometrische Bestimmung von Thorium mit Quercetin auszuschalten, wurde die Anwendbarkeit folgender Anionen bzw. Verbindungen studiert: Hydrogencarbonat, Cyanid, Fluorid, Phosphat, Rhodanid, Sulfosalicylat, Tartrat, Ascorbinsäure, Dipyridyl, Hydrazin, EDTA und Triäthanolamin.

Von den angeführten Anionen bzw. Verbindungen erwies sich nur Ascorbinsäure in Verbindung mit Kaliumrhodanid geeignet.

Für die folgenden Versuche wurden außer den schon erwähnten Reagenzien und Lösungen noch folgende verwendet:

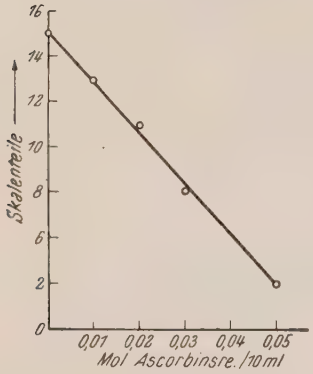


Abb. 6

Ascorbinsäure (DAB 6) in tridest. Wasser gelöst (1-m, 0,4-m und 0,2-m);

Eisen(III)-chloridlösung (100 μg Fe/ml, in 0,01-n HNO_3);

Uranylnitratlösung (100 μg U/ml in 0,01-n HNO_3);

Salzsäure p. a. (Merck), durch Verdünnen 0,1-n;

Seltene-Erden-Lösung (etwa 100 μg des Gemisches* Seltener Erden/ml in 0,01-n HNO_3);

Kaliumrhodanid p. a. (Merck).

a) Einfluß der Ascorbinsäurekonzentration

Lösungen, die 1 μg Th in 2 ml 0,01-n HNO_3 enthielten, wurden mit zunehmenden Mengen Ascorbinsäure, dann mit 3 ml der 0,01%igen Quercetinlösung versetzt und mit Pufferlösung ($p_H = 5{,}6$), deren Volumen zumindest 4 ml betrug, aufgefüllt. Die Absorption dieser Lösungen wurde gegen eine gleichartig bereitete Lösung ohne Ascorbinsäure verglichen.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, sinkt die Absorption mit zunehmender Ascorbinsäurekonzentration, was wohl auf die Bildung eines Th-Ascorbinsäurekomplexes zurückzuführen sein dürfte. Die Ascorbinsäurekonzentration muß der Menge der anwesenden Fremdionen angepaßt werden. Für die Bestimmung von 2 bis 60 μg Th bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 μg Eisen wurde 1 ml einer 0,4-m Ascorbinsäurelösung in Wasser für 10 ml der Endlösung als geeignet gefunden. Das der Lösung ebenfalls zuzusetzende KSCN (s. unten) ist ohne Einfluß auf deren Extinktion.

b) Quantitativer Einfluß von Eisen, Uran und Seltenen Erden

Während 1 ml einer 0,4-m Ascorbinsäurelösung den Einfluß der

---

* La Ce Pr Nd Sm Eu Gd Tb Dy Ho Er Tm Yb Cp
1 1 10 55 20 2 8 0,2 1 0,2 0,5 0,1 0,5 0,05%
Das Präparat wurde uns dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. Ing. *A. Brukl* überlassen.

mindestens zehnfachen Menge Seltener Erden praktisch vollständig beseitigt, werden durch die Anwesenheit der zehnfachen Uranmenge oder von Eisenmengen über 100 μg Messungen unmöglich.

Da aber nach einem bestimmten Anreicherungs- bzw. Abtrennungsverfahren die mit Thorium anfallenden Eisenmengen meist 100 μg nicht übersteigen, der Urangehalt der meisten natürlichen Gesteine an sich nur ein Bruchteil deren Gehaltes an Thorium ist und die mehr als zehnfache Menge Seltener Erden — bezogen auf Th — ohne Einfluß auf die Bestimmung ist, können derartige Thoriumkonzentrate unmittelbar zur Messung verwendet werden.

Beträgt aber der mit dem Thorium nach einem Anreicherungsverfahren anfallende Eisengehalt der Probe mehr als 100 μg, so kann das Fe^{3+}-Ion durch Ausäthern aus 6-n salzsaurer wäßriger Lösung leicht entfernt werden.

Arbeitsvorschrift

Die zu messende Thoriumlösung (2 bis 60 μg Th), die nicht mehr als die zehnfache Menge Seltener Erden und Uran, sowie nicht mehr als 100 μg Eisen enthalten darf — der Eisenüberschuß kann durch Ausäthern aus 6-n salzsaurer Lösung rasch entfernt werden —, wird auf dem Wasserbad zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird in 2 ml 0,1-n HCl aufgenommen, in einen 10-ml-Meßkolben gebracht und mit 1 ml einer 0,4-m Ascorbinsäurelösung in Wasser versetzt. Nach Zugabe einer Spatelspitze KSCN wird gut umgeschwenkt, mit 3 ml einer 0,1%igen Quercetinlösung in redest. Äthanol versetzt, gut geschüttelt und mit Pufferlösung ($p_H = 5{,}6$) aufgefüllt. Die Messung erfolgt mit einem Beckman-Spektrophotometer, Modell B, unter Verwendung von 1-cm-Küvetten im Bereich zwischen 425 und 450 mμ. Bei 445 mμ ist der Einfluß der Fremdionen geringer als bei der optimalen Wellenlänge für reine Thoriumlösungen (430 mμ).

Für die Bestimmung von Thoriummengen von 1 bis 10 μg eignet sich das Lange-Kolorimeter mit Galvanometerzusatz. In diesem Konzentrationsbereich arbeitet man wie oben angegeben, nur werden 3 ml einer 0,01%igen Quercetinlösung an Stelle der entsprechenden, oben angeführten Lösung angewendet. Es werden Küvetten von 34 mm Schichtdicke, mit einem Volumen von etwa 5 ml und Interferenzfilter geeigneter Durchlässigkeit (425 bis 450 mμ) benützt.

Bei Verwendung des Lange-Kolorimeters und des uns zu diesem Gerät zur Verfügung stehenden Interferenzfilters (460 mμ) störten die Seltenen Erden und Uran bis zur zehnfachen Menge des zu bestimmenden Thoriums nicht, wohl aber Eisen schon in fünffachem Überschuß.

Herrn Prof. Dr. *F. Hecht*, der diese Arbeit ermöglichte, sei für seine Unterstützung herzlich gedankt.

Zusammenfassung

Es wird eine photometrische Bestimmung von Thorium beschrieben, die es gestattet, 0,1 bis 6 μg Th/ml in Gegenwart der fünf- bis zehnfachen Menge an Eisen, Uran und Seltenen Erden zu bestimmen.

Summary

A photometric method is described which permits the determination of thorium in amounts of 0.1 to 6 μg Th/ml in the presence of 5 to 10 times the amount of iron, uranium, and rare earths.

Résumé

Description d'un dosage photométrique du thorium permettant la détermination de 0,1 à 6 μg de thorium/ml en présence de quantités cinq à dix fois plus élevées de fer, d'uranium et de terres rares.

Literatur

[1] *E. Tomic* und *H. Khalifa*, Z. analyt. Chem. (im Druck).
[2] *F. Hecht* und *W. Ehrmann*, Z. analyt. Chem. **100**, 98 (1935).
[3] *M. Malak*, *V. Suk* und *O. Ryba*, Chem. Listý **48**, 533 (1954).
[4] *G. S. Walpole*, J. Chem. Soc. London **105**, 2501 (1914).

From the Microanalytical Laboratory, Department of Organic Chemistry, The University, Liverpool, England

The Microdetermination of Alkoxyl Groups

By

A. S. Inglis

With 2 Figures

(Received February 15, 1957)

The alkoxyl determination has been the subject of many papers purporting to overcome difficulties with the design of the apparatus, the components of the reaction mixture, the time for quantitative fission of the substance, and the elimination of a blank value. Unfortunately, much of the information appears to be contradictory, and, although some workers undoubtedly have found conclusive evidence for the cause of erratic results within their own experience, there has not been any attempt to clarify the position as a whole. This paper stresses the importance of a *fast* rate of gas flow for the best results, and suggests that some of the conflicting reports may be due to the lack of an awareness of this factor. The method that is recommended is simple and rapid, and the analyses of some difficult substances have proven that it is suitable for routine work.

Contrasting reports appeared quite soon after adaption of *Zeisel*'s[1] procedure to the micro scale, when some workers[2,3] found it necessary to add a correction to the weight of silver iodide obtained in a determination, whilst others[4,5] did not. Then, sodium thiosulphate solutions, alone[2,6] and mixed with cadmium sulphate solution[7–9], were used as wash solutions instead of a red phosphorus suspension; however, *White*[10] found that sodium thiosulphate solution retained methyl iodide, although it was satisfactory when mixed with an equal amount of cadmium sulphate solution; more recently, *Heron*, et al.[11] and *Franzen*, et al.[12], showed that even the mixed solutions gave unsatisfactory values. The wash solution has been heated to facilitate removal of the methyl iodide[9,11,13], yet *Colson*[5] found that this heating produced low results, probably because

it caused hydrolysis of the methyl iodide. Such differences are sufficient to suggest that compensating errors may still exist in this determination.

Rate of Gas Flow

If one considers that, in a micro methoxyl determination, a few milligrams of methyl iodide, b. p. 42°, are collected after passing through a cold aqueous solution, and that the solubility of methyl iodide is approximately 14 mg/ml, there is justification for doubt as to the quantitative nature of the process. On the other hand, since *Fox* and *Martin*[14] dried carbon tetrachloride by passing air through it, and since, in polarography, gases are passed through solutions to remove dissolved oxygen, a fast flow of gas through the wash solution should act similarly in the methoxyl estimation and remove dissolved methyl iodide. Moreover, as methyl iodide (MW 142) is much heavier than both carbon dioxide (MW 44) and nitrogen (MW 28) (the gases normally used as carriers), difficulty would be expected in removing it quantitatively from the apparatus with slow gas rates, especially if one remembers that even isotopes may be separated by their different rates of diffusion through porous plugs. Indeed, the experiments of *Houghton* and *Wilson*[15] actually illustrate this point: they obtained a blank value which could almost be eliminated if plugs of glass or cotton wool were inserted in the apparatus, but could not give an explanation for the low analytical results when the plugs were used.

Slow rates of gas flow are often recommended, presumably to minimise blank values and ensure quantitative absorption of the alkyl iodide, so this factor could also explain why some workers found it necessary in the gravimetric determination to add a correction to the weight of silver iodide. It would also furnish an explanation for the results of *Guillemet*[28], who obtained correct values for methoxyl determinations but low values for ethoxyl determinations. As ethyl iodide is less volatile than methyl iodide it should require a faster gas flow for its complete removal from the apparatus; under the conditions of *Guillemet* it is possible that the rate was satisfactory for methoxyl determinations, but unsatisfactory for ethoxyl determinations. This explanation is at least more probable than *Guillemet*'s, because he thought that the low values for ethoxyl were due to the solubility of ethyl iodide in the wash solution, whereas the solubility of methyl iodide in water is about four times greater than that of ethyl iodide.

From the above reasoning, carbon dioxide would be expected to be a superior carrier to nitrogen. Accordingly, the results obtained with carbon dioxide as carrier (Table I) compare very favourably with those of *Houghton* and *Wilson*[15] and *Kirsten* and *Ehrlich-Rogozinsky*[16] who used nitrogen; thus, even including reaction of the substance, methyl

iodide was recovered quantitatively in $7^1/_2$ minutes, whereas *Kirsten* and *Ehrlich-Rogozinsky*, with a faster gas flow, required 12 minutes for the distillation of methyl iodide; when ethyl and butyl iodides were distilled the difference became quite marked. It should be added, however, that the jacket of the apparatus was filled with boiling water for the butoxyl determination.

Table I. Time Required for Quantitative Recovery of Alkyl Iodide

Authors	Alkyl Iodide	Time of Distillation (min)	Rate of Gas Flow (ml/min)	Carrier Gas
*Inglis**	CH_3I	$7^1/_2$	15	CO_2
	C_2H_5I	$7^1/_2$	15	CO_2
	C_4H_9I	$7^1/_2$	15	CO_2
Houghton and *Wilson**	CH_3I	35	6	N_2
Kirsten and *Ehrlich-Rogozinsky*	CH_3I	12	25	N_2
	C_2H_5I	22	25	N_2
	C_4H_9I	60	25	N_2

* Time of distillation includes reaction time as well; vanillin, phenacetin and butyl alcohol respectively were added to the flask.

The different findings regarding thiosulphate wash solutions may be attributed, in part, to the rate of gas flow. The analytical results tabulated in this paper were obtained with a wash solution consisting of equal amounts of sodium thiosulphate and cadmium sulphate solutions. Table II shows that losses of methyl iodide may occur with a sodium thiosulphate/cadmium sulphate wash solution, but under the recommended conditions this source of error is negligible for a microdetermination. Although the rate of gas flow is obviously important, it should be noted also that we took only 1 ml of wash solution, whereas *Franzen*, et al.,

Table II. Some Recoveries of Methyl Iodide in the Modified Apparatus

Washer	Vol (ml)	Rate (ml/min)	Distillation Time (min.)	Wt. taken (mg)	Fd. (mg)	Diff. μg
5% $CdSO_4$ / 5% $Na_2S_2O_3$	1	15	10	4.653	4.646	— 7
				3.486	3.481	— 5
				9.030	9.038	+ 8
,,	1	10	10	5.452	5.428	— 24
,,	1	9	10	9.524	9.482	— 42
				3.370	3.324	— 46
,,	1	(a) 9 (b) 15	(a) 10 (b) 10	7.256	7.235	— 21
5% $Na_2S_2O_3$	1	15	10	5.414	4.992	— 422
,,	1	10	10	7.265	6.598	— 667

and *Heron*, et al., who deprecate the use of a sodium thiosulphate/cadmium sulphate solution, took 4 ml; this probably accounts for the fact that the losses of methyl iodide were lower than those found by these workers.

In view of the excellence of a sodium thiosulphate/cadmium sulphate solution as a scrubbing medium, and the advantages of the fast rate of gas flow which is necessary when this solution is employed, it was retained as the wash solution.

The Blank Value

Kirsten and *Ehrlich-Rogozinsky*[16] have shown that fast rates may be used without increasing the blank value. The results of our experiments were in agreement with this. Various experiments under abnormal conditions always indicated that iodine, and not hydriodic acid, was the source of the blank value; it was retained by the usual wash solutions containing either sodium thiosulphate or red phosphorus, but not by sodium carbonate or sodium bicarbonate solutions under extreme conditions.

A synthetic acid[29] was made for these experiments in order to eliminate the possibility of a blank value from impurities in the acid. It can be recommended, for it is conveniently and cheaply prepared.

Incomplete Reaction with Hydriodic Acid

There is varied opinion as to the reaction conditions required for the quantitative fission of the alkoxyl group. There does not appear to be much evidence to support the view[7] that the difficulty of removal of the methoxyl group is dependent on, and increases with the number of methoxyl groups in the substance. *Ghaswalla* and *Donnan*[17], who studied the effect of nuclear substituents on the rate of fission of ethers, found that aromatic ethers with *o*-,*p*-directing groups reacted faster than those with *m*-directing substituents. The rates of reaction of methoxy anisoles were quite high compared with the other rates of reaction and this was attributed to a probability factor—there are two methoxyl groups which may be attacked and therefore greater chance of formation of the proposed intermediate oxonium compound.

$$\mathrm{PhOR + HX \rightarrow [Ph{-}O{-}\overset{\mathrm{H}}{\underset{|}{R}}]^{+}X^{-} \rightarrow PhOH + RX}$$

They also found that phenetoles reacted faster than anisoles.

A study of the effect of the time of boiling and the temperature of the hydriodic acid upon the methoxyl results was made for various substances and this showed that the reaction with hydriodic acid is generally very fast at the boiling temperature (Table III).

Table III. Effect of Time and Temperature upon Alkoxyl Value

Compound	No. of Groups	Temp. of Acid (° C)	Time of Heating (min)	Fd. (%)	Calc. (%)	Diff. (%)
Narcotine	3	127	7½	22.5	22.5	0.0
		120	30	22.6	22.5	+ 0.1
		110	30	14.9	22.5	— 7.6
		100	30	7.6	22.5	— 14.9
		80	30	4.6	22.5	— 17.9
Vanillin	1	127	7½	20.4	20.4	0.0
		120	30	12.9	20.4	— 7.5
		110	30	16.8	20.4	— 3.6
		100	30	10.3	20.4	— 10.1
		80	30	4.9	20.4	— 15.5
Veratrole	2	127	7½	44.8	44.9	— 0.1
		120	30	44.9	44.9	0.0
		110	30	42.3	44.9	— 2.6
		100	30	30.7	44.9	— 14.2
Tetramethyl-methylglucoside	5	127	7½	61.5	62.0	— 0.5
		120	30	51.2	62.0	— 10.8
		110	30	47.3	62.0	— 14.7
		100	30	35.2	62.0	— 26.8
Methylated lignin	15	127	7½	30.1	30.1	0.0
		120	30	29.3	30.1	— 0.8
		110	30	25.2	30.1	— 4.9
		100	30	21.4	30.1	— 8.7
Melicopicine	4	127	7½	35.7	37.7	— 2.0
		127	15	36.7	37.7	— 1.0
		127	30	37.5	37.7	— 0.2
		120	30	34.4	37.7	— 3.3
		110	30	31.0	37.7	— 6.7
		100	30	21.8	37.7	— 15.9
o-Methoxytriphenyl methyl ethyl ether	2	127	30	19.4	19.5	— 0.1
		127	30	19.5	19.5	0.0
9,10-Dimethoxy-1,2,5,6-dibenzanthracene	2	127	30	18.3	18.3	0.0
				18.2	18.3	— 0.1
Dimethoxytriphenylene dioxide*	2	127	30	19.3	19.5	— 0.2
				19.3	19.5	— 0.2
Anisole	1	127	30	28.6	28.7	— 0.1
				28.5	28.7	— 0.2
Ethyl formate	1	127	30	60.8	60.8	0.0
				60.5	60.8	— 0.3

* The specimen of this compound was kindly supplied by Professor *H. Erdtman* of Kungl. Tekniska Högskolan, Stockholm, Sweden.

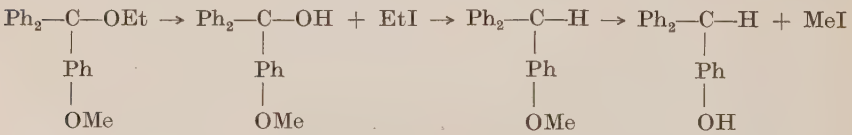
Melicopicine showed peculiarity in that most of the methyl iodide was formed in the usual time yet the last few percent were removed very slowly. This behaviour has been observed with some research samples which have required as long as 45 minutes boiling.

It may be seen also that 9,10-dimethoxy-1,2,5,6-dibenzanthracene[18] and dimethoxytriphenylenedioxide[19], both of which have been reported to give zero methoxyl values, were analysed successfully with a reaction time of only 30 minutes. However, further work must proceed on other more intractable substances[16,20] in order to establish this determination as a rapid, accurate, and reliable one for all substances.

Phenol as Solvent

The results of the above analyses could also have been influenced by the reaction mixture, which contained large amounts of phenol. *Weishut*[21] found that phenol functioned both as a solvent and as a catalyst in the reaction, and, recently, *Mayer*[22] has shown that large amounts are necessary for the analysis of tetramethylellagic acid.

The analytical results for *o*-methoxytriphenylmethyl ethyl ether indicated that it was preferable to use phenol alone as the solvent because admixtures with acetic or propionic anhydrides gave low results. The compound loses the ethoxyl group in the cold forming the carbinol which is then reduced to the substituted methane. The initial solubility of the large molecule is not very great, but with the removal of the hydroxyl group it is decreased further and actually separates as an oil in the presence of acetic or propionic anhydrides.



Analysis of Anisole

In order to analyse anisole correctly, *Colson*[5] suggested that hydriodic acid of S. G. 1.94 and a special type of apparatus were required, as he found that all other modifications, including sealed tube and double distillation procedures, failed to give satisfactory results.

In *Colson*'s experiments with a double distillation procedure, the hydriodic acid which was placed in the second flask was brought to the boil before commencement of the reaction in the first, and a slow stream of gas was passed through the apparatus during the entire analysis. The more recent method of *Steyermark*[23] also adopts this procedure. Initial experiments with double distillation procedures tended to confirm

the findings of *Colson*, but success was achieved with one that required only a simple modification of the reaction flask (Fig. 1); thus, after the reaction mixture had been added to the flask in the normal manner, the second reaction vessel was formed by insertion of the internal adaption and addition of phenol and hydriodic acid. The main differences in our conditions were: (1) the solution above the reaction mixture was cold at the beginning of the analysis thereby acting as a condenser to vapours; (2) solvent was placed in both lots of hydriodic acid; (3) the gas flow was reduced to the very minimum for the first 10 minutes of the analysis.

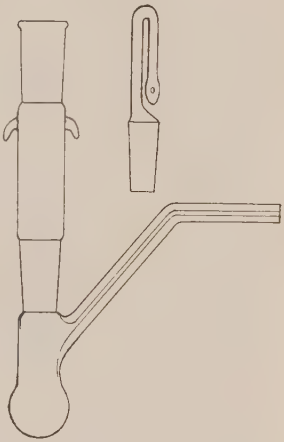


Fig. 1

Volatile liquids

The above modification could of course be used for volatile liquids, but it is not necessary for the simple esters and alcohols which react extremely rapidly with hydriodic acid. The problem with these substances is to bring them into contact with the acid underneath its surface[24]. This is done most simply by weighing them in capillaries of such length that the liquid is still above the surface of the acid after it has been centrifuged to the tail and the capillary dropped tip first into the acid. The liquid is ejected from the capillary only when the acid is hot, hence conditions are suitable for complete reaction.

Apparatus

The apparatus (Fig. 2) is simple and robust.

The jacket surrounding the spiral tube is filled with cold water for methoxyl and ethoxyl determinations but boiling water for higher alkoxyl determinations.

The absorption system, which is a modification of that of *White* and *Wright*[25], is completely efficient with very fast rates of gas flow, and quantitative transfer of absorption solution from the receiver to the titration flask is quick and simple. With the modified system the bubbles issuing from the tapered delivery tube are checked at the bulbs and form a gas pocket from which small bubbles are then forced up through the top layer of absorption solution. The size of the pocket depends upon the rate of gas flow and the snugness of the fit with the receiver—if a sudden increase in gas pressure occurs a larger pocket is merely formed and small bubbles are still pressed up through the solution,

hence eliminating the danger of loss due to large bubbles passing quickly through the solution.

Although the *Rigakos*[26] flask is satisfactory in preventing bumping of the hydriodic acid, it was not used because there is a possibility of error due to sample remaining unreacted in the inlet tube. The reaction

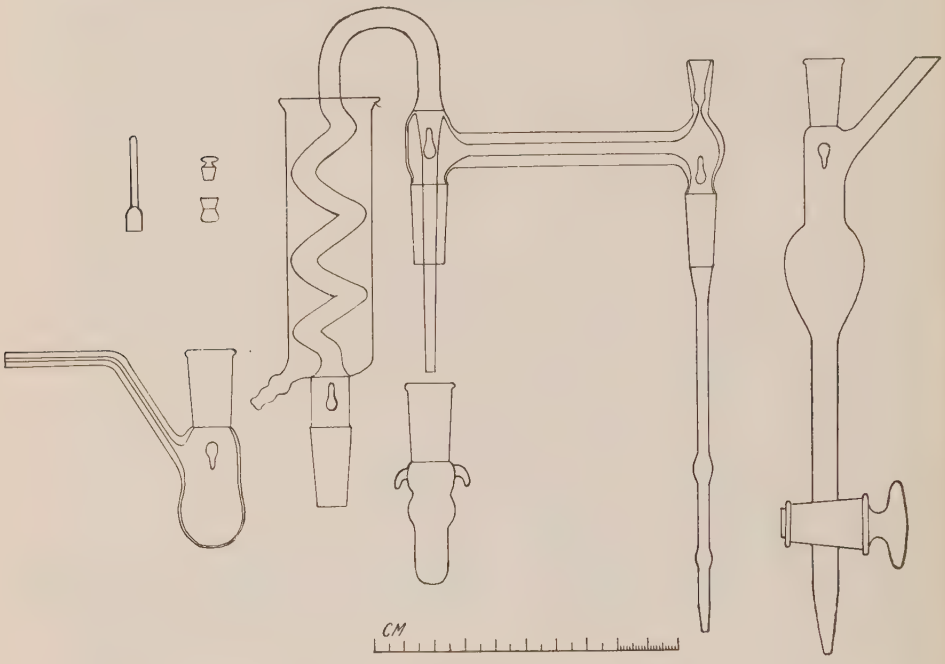


Fig. 2

flask with a normal side arm and a boiling tube as proposed by *Clark*[27] was preferred.

Dry ice was used as the source of carbon dioxide. It was placed in a thermos flask fitted with a mercury pressure head, and passed through a bubbler of concentrated sulphuric acid prior to entering the apparatus. The rate of gas flow was checked at the bubbler and regulated by means of a screw clip.

The reaction flask was placed in an electrically heated air bath.

Reagents

Hydriodic acid S. G. 1.7.
Phenol A. R.
Cadmium sulphate 5%.

Sodium thiosulphate 5%.

Sodium acetate (hydrated) 20%.

Bromine-sodium acetate-acetic acid: After dissolving sodium acetate A. R. (40 g) in glacial acetic acid A. R. (400 ml), bromine A. R. (4 ml) was added.

Formic acid 95%.

Potassium Iodide A. R.

Sulphuric Acid A. R. 20%.

Starch 1%: Soluble starch (1 g) was made into a paste with cold distilled water and added to boiling distilled water (100 ml) with stirring. A few milligrams of mercuric iodide were added as a preservative.

Sodium thiosulphate 0.02 *N*: Anhydrous sodium carbonate (0.2 g) was dissolved in distilled water (600 ml), sodium thiosulphate (5 g) was added and the solution was made up to 1 litre.

Potassium iodate 0.02 *N*: Exactly 0.7134 g of dried potassium iodate A. R. were weighed on a watch glass, carefully transferred to an "A" 1-litre flask, and made up to the mark with distilled water at 20°. The solution was used to standardize the sodium thiosulphate solution.

Procedure

(a) *Solids:* The substance was weighed in either a short handled weighing tube or a small glass bottle. The latter is preferable when low melting substances are to be analysed or silicone grease is used to seal faulty ground joints. Phenol (0.7 g, taken in a small scoop) was added to the flask, the substance was dissolved by gently warming the flask over a micro flame, the flask was cooled, and hydriodic acid (2 ml) and the boiling tube were added. The flask was connected quickly to the apparatus (sealing the joints with a drop of hydriodic acid), it was lowered into the heating bath, and the rate was adjusted to 12–15 ml/min. The mixture was boiled for 45 minutes.

At the end of the reaction time the apparatus was raised from the electric air bath, the receiver was lowered, and the inside and outside of the delivery tube were rinsed with distilled water. The solution was run into the titration flask which contained sodium acetate (10 ml). After the receiver had been rinsed three times with distilled water, the bromine was removed with formic acid (2 ml) and iodine was liberated with potassium iodide (0.1 g) and sulphuric acid (5 ml). The solution was titrated to the starch end point with sodium thiosulphate solution.

(b) *Liquids:* The modified reaction flask (Fig. 1) was used for liquids that boiled above the boiling point of the reaction mixture. They were weighed in a small glass bottle with a ground glass stopper and dropped into the reaction flask which contained the boiling tube, phenol (0.7 g), and hydriodic acid (1 ml). The inner portion was inserted and the same

amounts of phenol and hydriodic acid added to form the second reaction solution. (The cone of this inner portion should be lightly smeared with silicone grease to ensure a good seal at the joint, otherwise there is danger of the joint becoming loose and hydriodic acid leaking into the bottom container.) The flask was connected to the apparatus and the flow of carbon dioxide adjusted to an extremely slow rate. After the reaction mixture had boiled for 10 minutes it was increased to the normal fast rate of 12–15 ml/min for another 30 minutes. The analysis was completed as described for solids.

(c) *Volatile liquids:* The liquids were weighed in the usual glass capillaries with very fine capillary tips. The length of the capillary was about 2 cm and the length of the tail about 1 cm. The liquid was introduced and centrifuged to the tail before weighing. When it was dropped, tip downwards, into the flask containing the reaction solution the volatile liquid could be seen plainly above the surface of the hydriodic acid. The gas flow was almost negligible until the liquid had been expelled from the capillary, after which it was increased to 12–15 ml/min and the analysis completed as above.

The apparatus was cleaned after analyses by rinsing once with water and twice with acetone. It was attached to the pump to remove most of the acetone, dried at 120° for 5 minutes, and again attached to the pump to remove the last traces.

The wash liquid, 0.5 ml each of cadmium sulphate and sodium thiosulphate, was added to the washer which was connected to the apparatus and held by springs.

The delivery tube was sealed at the top with a drop of distilled water and closed with a rubber tubing containing a glass rod. The receiver was half-filled with the bromine-sodium acetate-acetic acid solution and held in place by a spring.

Acknowledgment

The author wishes to thank Professor *Alexander Robertson*, F. R. S., for his continued encouragement of this work, and Dr. *Zimmermann*, who supervised its inception at the University of Melbourne in 1951.

Summary

An improved method for the microdetermination of alkoxyl groups is described. A simple modification of the method may be used for liquids such as anisole that cannot be analysed by the normal procedures.

It is shown that the reaction of the substance with hydriodic acid in the presence of phenol is usually very fast at the boiling temperature, and depends on the configuration of the molecule rather than on the number of alkoxyl groups present. The analyses of 9,10-dimethoxy-

1,2,5,6-dibenzanthracene and dimethoxytriphenylenedioxide were successful although both have been reported to give zero values.

Attention is drawn to the conflicting reports that have appeared in the literature in connection with the alkoxyl determination, and it is shown that a fast rate of gas flow is most important if the best results are to be obtained from this determination.

Zusammenfassung

Es wird eine verbesserte Methode zur Mikrobestimmung von Alkoxylgruppen beschrieben. Eine geringe Abänderung dieses Verfahrens eignet sich zur Analyse von Flüssigkeiten, wie z. B. Anisol, die nach der normalen Arbeitsweise nicht analysiert werden können. Es zeigte sich, daß die Reaktion der Substanz mit siedender Jodwasserstoffsäure bei Gegenwart von Phenol gewöhnlich sehr rasch verläuft und mehr von der Konfiguration des Moleküls als von der Zahl der Alkoxylgruppen abhängt. Die Analyse von 9,10-Dimethoxy-1,2,5,6-dibenzanthracen und Dimethoxytriphenylendioxyd verlief einwandfrei, obwohl von beiden Substanzen angegeben wurde, daß sie negative Ergebnisse liefern.

Auf die widersprechenden Literaturangaben über die Alkoxylbestimmung wird hingewiesen und gezeigt, daß ein rascher Gasstrom von größter Bedeutung für die Erzielung guter Resultate bei dieser Bestimmungsmethode ist.

Résumé

Description d'une méthode améliorée de microdosage des groupes alcoxyles. On peut utiliser une modification simple de la méthode pour son application à des liquides tels que l'anisole qui ne peuvent être analysés par mise en oeuvre des modes opératoires normaux.

L'auteur montre que la réaction de la substance avec l'acide iodhydrique en présence de phénol est habituellement très rapide à la température d'ébullition et dépend plus de la configuration de la molécule que du nombre de groupes alcoxyles présents. Les analyses du diméthoxy 9,10, dibenzanthracène 1,2,5,6 et du diméthoxytriphenylénedioxyde ont donné des résultats satisfaisants bien que la littérature indique qu'ils sont alors nuls.

L'auteur remarque d'ailleurs les contradictions que l'on peut relever dans la littérature relativement au dosage des alcoxyles et montre qu'un courant gazeux rapide est un facteur des plus importants conditionnant l'obtention des meilleurs résultats.

References

[1] *S. Zeisel*, Mh. Chem. **6**, 989 (1885).

[2] *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse. Leipzig: Deuticke. 1933. p. 133.

[3] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 6. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*. Wien: Springer-Verlag. 1949.

[4] *V. Bruckner*, Mikrochem. **12**, 153 (1932).

[5] *A. F. Colson*, Analyst **1955**, 594.

[6] *K. H. Slotta* and *G. Haberland*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 127 (1932).

[7] *A. Elek*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 174 (1939).

[8] *B. E. Christensen, L. Friedman*, and *Y. Sato*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 276 (1941).

[9] *A. J. Bayley*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 181 (1942).
[10] *E. P. White*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 207 (1944).
[11] *A. E. Heron, R. H. Reed, H. E. Staff* and *H. Watson*, Analyst **1954**, 671.
[12] *Fr. Franzen, W. Hegemann*, and *W. Disse*, Mikrochem. **39**, 277 (1952).
[13] *W. G. Campbell*, J. Soc. Chem. Ind. **51**, 590 (1943).
[14] *J. J. Fox* and *A. E. Martin*, Proc. Roy. Soc. London **A 174**, 234 (1940).
[15] *A. A. Houghton* and *H. A. B. Wilson*, Analyst **1944**, 363.
[16] *W. Kirsten* and *S. Ehrlich-Rogozinsky*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 786.
[17] *R. P. Ghaswalla* and *F. G. Donnan*, J. Chem. Soc. London **1936**, 1341.
[18] *G. M. Badger, J. W. Cook*, and *P. A. Ongley*, J. Chem. Soc. London **1950**, 867.
[19] *H. Erdtman*, Proc. Roy. Soc. London **A 143**, 234 (1933).
[20] *H. Gysel*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 743.
[21] *F. Weishut*, Mh. Chem. **33**, 1165 (1912).
[22] *W. Mayer*, Z. analyt. Chem. **141**, 345 (1954).
[23] *Al Steyermark*, Analyt. Chemistry **20**, 368 (1948).
[24] *D. O. Hoffman* and *M. L. Wolfrom*, Analyt. Chemistry **19**, 225 (1947).
[25] *E. V. White* and *G. F. Wright*, Canad. J. Res. **14**, 427 (1936).
[26] *D. R. Rigakos*, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 3903 (1931).
[27] *E. P. Clark*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **15**, 136 (1932).
[28] *R. Guillemet*, Bull. soc. chim. France **51**, 1547 (1932).
[29] *R. B. Bradbury*, Mikrochem. **38**, 114 (1951).

Aus der Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt Wien

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren in Futtermitteln. Das Kartoffeleiweiß

Von

A. Kastell

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 25. April 1957)

Das bei der Verarbeitung der Kartoffel auf Kartoffelstärke in großer Menge anfallende Fruchtwasser enthält neben anderen anorganischen und organischen Stoffen auch den größten Teil des Eiweißes der Kartoffelknolle gelöst und stellt somit eine wertvolle Eiweißquelle für die Tierfütterung dar. In Österreich wird dieses Eiweiß von der landwirtschaftlichen Kartoffelverwertungs A. G. auf einem besonders energiesparenden Weg gewonnen. Dabei wird es durch Hitze koaguliert, separiert und getrocknet, wodurch sich etwa 50% des im Fruchtwasser enthaltenen Proteins gewinnen lassen.

An der Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt durchgeführte Fütterungsversuche ließen die vorzügliche Eignung des Kartoffeleiweißes als Futtermittel erkennen. Dieses zeigte sich dem Tierkörpermehl – beide hatten etwa den gleichen Gehalt an verdaulichem Reineiweiß — in der Schweinefütterung ebenbürtig. Dies ist um so bemerkenswerter, als man in der Schweinefütterung das tierische Eiweiß als unentbehrlich anzusehen pflegt. Es lag daher nahe, diesen Fütterungserfolg einer besonders günstigen Zusammensetzung des Kartoffeleiweißes bezüglich der essentiellen Aminosäuren zuzuschreiben.

Die Bewertung eines Eiweißfuttermittels auf Grund seiner Aminosäurezusammensetzung gewinnt in der Tierernährung immer mehr an praktischer Bedeutung, seitdem man erkannt hat, daß nur ein Eiweiß, das in seiner Zusammensetzung dem Bedarf des Tieres an essentiellen Aminosäuren voll entspricht, restlos ausgenützt werden kann, also biologisch vollwertig ist. Da jedoch die Kenntnis der Aminosäurebedarfszahlen der einzelnen Tierarten noch recht lückenhaft ist, benützt man

vorläufig das Milchprotein und das Eiprotein als Bezugsproteine, denen man die biologische Wertigkeit 100 zuschreibt. Alle anderen Futterproteine haben eine geringere Wertigkeit, bedingt durch einen Mangel an einer oder an mehreren essentiellen Aminosäuren. Mischungen, bei denen die Minderwertigkeit eines Eiweißfutterstoffes durch die Gegenwart anderer, die diese mangelnden Aminosäuren im Überschuß enthalten, ausgeglichen wird, sind naturgemäß hochwertiger. Eine Steigerung der Wertigkeit durch Ergänzungswirkung ist jedoch nur bis zu einer gewissen Grenze möglich, eine weitere Erhöhung könnte nur durch Zusatz synthetischer Aminosäuren erfolgen, wie dies in Amerika zum Teil bereits geschieht.

Die rationellste Zusammenstellung derartiger Futtermischungen ist jedoch nur bei genauer Kenntnis der Aminosäuregehaltszahlen der einzelnen Futtermittel möglich, verlangt also zunächst genaue Eiweißbausteinanalysen der verschiedensten Futtermittel. Da geplant ist, derartige Untersuchungen auch an der Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt durchzuführen, wurde bei der Bestimmung der Aminosäuren des Kartoffeleiweißes gleich versucht, den Arbeitsgang allgemein anwendbar auszubauen. Gewählt wurde hierzu die papierchromatographische Methode.

Einer quantitativen Papierchromatographie stehen zwei Schwierigkeiten im Wege. Einerseits treten während der Wanderung und auch beim Wegtrocknen des Verteilungsmittels unkontrollierbare Verluste auf, die bei eindimensionalen Chromatogrammen bis zu 20%, bei zweidimensionalen 30 bis 40% betragen können, und anderseits ist auch die Ninhydrinreaktion nicht einwandfrei reproduzierbar. Eine quantitative zweidimensionale Papierchromatographie ist daher — trotz vieler gegenteiliger Behauptungen — unmöglich. Eindimensional lassen sich jedoch diese Schwierigkeiten umgehen, wenn man Vergleichslösungen bekannten Gehaltes mitentwickelt, auf deren Meßwerte die zu analysierende Lösung bezogen wird[1]. *McFarren*[2] gibt eine Reihe gepufferter Verteilungsmedien an, mit denen es möglich ist, auf gepuffertem Papier aus einem Gemisch jede beliebige Aminosäure zu isolieren. Die sich für den vorliegenden Fall eignenden Verteilungsmedien und die damit zu trennenden Aminosäuren sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Trennung des Leucins vom Isoleucin soll nach *McFarren* mit einem Gemisch Benzylalkohol-Butylalkohol 1 : 1 vom $p_H = 8{,}4$ oder mit Collidin vom $p_H = 9{,}0$ möglich sein. Da sich diese Trennung jedoch als äußerst ungenügend erwies, wurde bisher für die nachstehenden Untersuchungen auf eine Trennung der beiden Aminosäuren verzichtet und nur ihre Summe bestimmt, was insofern möglich ist, als die beiden Aminosäuren mit Ninhydrin gleich intensiv gefärbte Verbindungen liefern.

Tabelle 1. Verteilungsmedien zur Isolierung der Aminosäuren

Phenol $p_H = 1{,}0$	Phenol $p_H = 12{,}0$	m-Kresol $p_H = 8{,}4$	o-Kresol $p_H = 6{,}2$	Lutidin $p_H = 6{,}2$
Cystin-Cystein	Asparagin-säure	Tyrosin	Tyrosin	Lysin
Alanin	Glutamin-säure	Histidin	Valin	Arginin
Tyrosin	Serin	Valin	Methionin	
Valin	Glycin	Methionin	Leucin + Isoleucin	
Methionin	Threonin	Leucin + Isoleucin	Phenylalanin	
Leucin + Isoleucin	Alanin	Phenylalanin		
Phenylalanin	Tyrosin			

Prolin läßt sich mit Benzylalkohol-Butylalkohol 1 : 1 vom $p_H = 1{,}0$ abtrennen und nach Blaufärbung mit Isatin bestimmen. Da es jedoch, ebenso wie Hydroxyprolin, nicht zu den essentiellen Aminosäuren gehört, wurde auf seine Bestimmung verzichtet, ebenso auf die der zwar leicht zu isolierenden Asparagin- und Glutaminsäure. Tryptophan, das bei der salzsauren Hydrolyse, die der Papierchromatographie vorangeht, zerstört wird, muß gesondert bestimmt werden. Hierzu wurde die Methode nach *Roth* und *Schuster*[3] herangezogen, die auf der Reaktion zwischen Tryptophan und Salpetersäure, der Xanthoproteinreaktion, beruht. Von den übrigen Aminosäuren bildet nur Tyrosin mit Salpetersäure einen gelben Farbstoff, der jedoch im Gegensatz zu dem des Tryptophans in der Siedehitze zerstört wird.

Zur quantitativen Bestimmung der papierchromatographisch getrennten Aminosäuren wird die Intensität der Farbflecke, die diese mit Ninhydrin bilden, gemessen. Dies kann sowohl auf dem Papier (Transparenzmessung) als auch nach der Elution des Farbflecks geschehen. Am einfachsten ist es, den Farbstoff in Methylalkohol zu lösen und die Extinktion des Eluates bei 570 mμ zu bestimmen. Innerhalb einer halben Stunde ist der Farbstoff vollkommen gelöst. Die Extinktion dieser Lösung ändert sich auch innerhalb von 24 Stunden nicht. *Bode*[4] und Mitarbeiter führen die Ninhydrinfarbflecke nach *Kawerau* und *Wieland*[5] in die Kupferkomplexe über und eluieren diese mit Methylalkohol. Die Extinktion der methanolischen Lösung kann bei 505 mμ gemessen werden.

Nur Cystein, Histidin und Methionin bilden so schwache Farbflecke, daß die Bestimmung nach diesen beiden einfachen Methoden nicht möglich ist. In diesem Fall werden die ausgeschnittenen Farbflecke in einer Eprouvette mit weiterer Ninhydrinlösung versetzt und im siedenden Wasserbad quantitativ ausgefärbt. Die zweite Anfärbung wird am besten unter gleichzeitiger Extraktion nach *Nehring*[6] vorgenommen. Jedoch mußte festgestellt werden, daß n-Butylalkohol, den *Nehring*

als Extraktionsmittel verwendet, nicht imstande ist, den bei der ersten Anfärbung auf dem Papier gebildeten Farbfleck quantitativ zu eluieren. Restlos hingegen geht der Farbstoff in Lösung, wenn man dem Butylalkohol nach dem Ausfärben Methylalkohol zusetzt.

Die vor der papierchromatographischen Trennung vorzunehmende Hydrolyse hat unbedingt mit dem gesamten Futtermittel zu erfolgen, da bei einer Isolierung von Eiweiß nur ein Teil gewonnen werden kann, der auf die Zusammensetzung des gesamten Eiweißes keinerlei Rückschlüsse zuläßt.

Während der Hydrolyse des Futtermittels treten, namentlich bei Gegenwart von Kohlehydraten, Verluste an Aminosäuren durch Bildung dunkler Substanzen, der Humine und Melanoide, auf. Bei der sauren Hydrolyse verteilen sich die Verluste auf alle Aminosäuren ziemlich gleichmäßig, bis auf das Tryptophan, das vollkommen zerstört wird. Zur papierchromatographischen Bestimmung des Tryptophans wäre daher eine alkalische Hydrolyse erforderlich, bei der hinwiederum die basischen Aminosäuren quantitativ zerstört werden, doch ist die Aufarbeitung des Hydrolysates infolge des hohen Salzgehaltes nach der Neutralisation so langwierig, daß auch aus diesem Grunde auf das Bestimmungsverfahren nach *Roth* und *Schuster* zurückgegriffen wurde.

Die Verluste durch Huminbildung lassen sich durch die Anwendung verschiedener Hydrolysekatalysatoren, wie $SnCl_2$, $TiCl_3$, $HgCl_2$, usw. und Arbeiten in einer Stickstoffatmosphäre oder durch einen großen Überschuß an Säure verkleinern. Durch den Säureüberschuß wird die Konzentration an Aminosäuren und Kohlehydratabbauprodukten klein gehalten, so daß beide in vermindertem Maße miteinander in Reaktion treten.

Nach *Kofrányi*[7] wird die störende Wirkung der Kohlehydrate dadurch beseitigt, daß man zunächst eine Hydrolyse der Kohlehydrate mit Ameisensäure durchführt und sodann nach Ausfällung aller Eiweißstoffe, Peptide und Aminosäuren mit Quecksilberacetat, diese mit Salzsäure zu Ende hydrolysiert. Cystein und Tryptophan müssen allerdings gesondert bestimmt werden. Diese Art der Hydrolyse ist immer bei der Untersuchung stärkereicher Produkte angezeigt, während sonst eine einfache Hydrolyse mit Salzsäure als ausreichend angesehen werden kann.

Untersuchungsmethodik

1. *Vorbereitung der Probe:* Zur Entfernung des Rohfetts wird zunächst die trockene, staubfein gemahlene Probe 8 Stunden hindurch im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die so vorbereitete Probe dient zur weiteren Untersuchung.

2. *Bestimmung des Tryptophans nach Roth-Schuster:* Eine Substanzmenge mit einem zu erwartenden Tryptophangehalt von 1,0 bis 10 mg wird in einem 100-ml-Meßkolben eingewogen, mit 10 ml Wasser aufgeschlemmt und vorsichtig mit 40 ml Nitriergemisch (100 ml 70%ige Schwefelsäure und 60 ml

25%ige Salpetersäure) versetzt. Nach 10 Minuten Stehen bei Zimmertemperatur bringt man den Kolben in ein siedendes Wasserbad, wo er unter häufigem Umschütteln 1 Stunde verbleibt. Nach dem Abkühlen füllt man mit 70%iger Schwefelsäure bis zur Marke auf und filtriert durch ein G 2-Glasfilter. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 420 mμ gegen ein Gemisch von Nitriersäure und 70%iger Schwefelsäure 1 : 1 als Nullösung.

3. *Hydrolyse:* Eine Menge, die einem Rohproteingehalt von 0,5 bis 1,0 g entspricht, wird in einem 1-l-Rundkolben genau eingewogen, mit 60 bis 250 ml halbkonzentrierter Salzsäure übergossen und 10 Stunden am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Hierauf wird im Vakuum eingedampft und, um die Salzsäure möglichst vollständig zu entfernen, mit etwas dest. Wasser aufgenommen und dann auf die gleiche Weise noch zweimal zur Trockene gebracht. Nun wird in heißem Wasser gelöst, durch ein Faltenfilter filtriert, gründlichst mit heißem Wasser nachgewaschen und abermals im Vakuum eingedampft. Der Eindampfrückstand wird in 10%igem Isopropylalkohol gelöst, in einen 50-ml-Meßkolben übergespült (eventuell unter erneutem Filtrieren) und zur Marke aufgefüllt. Im Kühlschrank ist die Lösung etwa einen Monat haltbar.

4. *Die Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl:* Diese hat in der Ausgangsprobe, im Hydrolysat und in den Filtrationsrückständen zu erfolgen. Auf den Proteingehalt des Hydrolysats werden sämtliche Resultate bezogen. Die Stickstoffverluste werden im allgemeinen nicht mehr als 5 bis 10% betragen.

5. *Die papierchromatographische Trennung* erfolgt absteigend auf S & S Filterpapier 2043 b senkrecht zur Papierfaserrichtung. In den von der Firma Haack zu beziehenden Chromatographierzylinder lassen sich zwei je 10 cm breite Papierstreifen, auf die je drei Startpunkte aufgetragen werden können, einbringen.

Die gepufferten Verteilungsmedien werden durch Schütteln gleicher Volumteile Lösungsmittel und Pufferlösung (Tabelle 2) hergestellt. Sämtliche Lösungsmittel müssen vor Gebrauch frisch destilliert werden, die Phenole werden durch Destillation über Zinkstaub gereinigt und durch Zusatz einiger mg Natriumcyanid vor erneuter Zersetzung geschützt. Die wäßrige Phase wird zum Sättigen der Atmosphäre auf den Boden des Glaszylinders geschüttet, die organische wird zur chromatographischen Trennung verwendet.

Tabelle 2

Pufferlösungen

p_H = 1,0: 50 ml 0,2-m KCl + 97 ml 0,2-m HCl
p_H = 6,2: 80 ml 0,067-m KH_2PO_4 + 20 ml 0,067-m Na_2HPO_4
p_H = 8,4: 50 ml 0,067-m H_3BO_3 und KCl + 8,55 ml 0,067-m NaOH
p_H = 12,0: 50 ml 0,067-m Na_2HPO_4 + 50 ml 0,067-m NaOH

Zur Herstellung der Verteilungsflüssigkeit Lutidin p_H = 6,2 wird der oben angegebene Puffer auf das Dreifache verdünnt.

Die Papierstreifen werden derart durch die Pufferlösung gezogen, daß diese über dem Papier nicht zusammenschlägt, waagrecht zwischen zwei Glasstäbe gespannt und mit einem Heißlufttrockner (Föhn) getrocknet. Auf die Startpunkte werden nun die Lösungen mit einer Mikropipette aufgetragen, und zwar in die Mitte die zu analysierende Lösung, rechts und links die Vergleichslösungen. Die aufgetragene Menge soll etwa 300 μg Protein betragen, zur Cystein-, Histidin- und Methioninbestimmung etwa 1000 μg.

Dabei hat man zu achten, daß sich die Lösung nicht allzusehr ausbreitet, höchstens zu einem Fleck von 1,0 bis 1,5 cm Durchmesser. Daher ist ein partielles Auftragen der Lösung erforderlich.

Die Papierstreifen werden anschließend in den Glaszylinder gebracht und über Nacht darinnen belassen, damit sie sich mit dem Lösungsmitteldampf sättigen. Die chromatographische Entwicklung dauert mit Phenol und den Kresolen als Verteilungsflüssigkeit zirka 40 Stunden. In dieser Zeit hat die Lösungsmittelfront das untere Ende des Streifens erreicht. Zur Bestimmung des Lysins und Arginins läßt man das Chromatogramm zirka 100 Stunden laufen, wobei das Lösungsmittel unten abtropft (Durchlaufchromatogramm).

Nach dem Entwickeln der Chromatogramme werden die Papierstreifen waagrecht im Luftstrom getrocknet, damit kein nachträgliches Zerfließen stattfindet, und anschließend, um die letzten Lösungsmittelreste zu entfernen, 30 Minuten in einen Trockenschrank von 105° gebracht.

Das Anfärben der fertigen Chromatogramme erfolgt mit einer 0,5%igen Ninhydrinlösung in 93% wassergesättigtem n-Butanol und 7% Eisessig, nach Phenol- ($p_H = 1$) Entwicklung mit 0,5%igem Ninhydrin in n-Butanol, das mit einer aus 2-n Essigsäure und 1-n Natronlauge 1 : 1 bestehenden Pufferlösung gesättigt ist. Vorteilhafter als Besprühen der Papierstreifen ist es, diese entgegengesetzt der Laufrichtung durch die Ninhydrinlösung zu ziehen. Die Streifen sind dann gleichmäßig durchtränkt, so daß überall die gleiche Anfärbung erfolgt. Hierzu werden die Papierstreifen 20 Minuten auf 105° erwärmt.

6. *Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren:*

a) Direkte Elution: Die Ninhydrinfarbflecke werden ausgeschnitten und die Papierstücke in Eprouvetten mit 5 ml Methanol übergossen. Nach einer halben Stunde wird die Extinktion der Lösung bei 570 mμ gemessen. Papierfasern werden mittels Filtration durch eine Glasfritte entfernt.

b) Elution nach Überführung in die Kupferkomplexe: Zu 1 ml einer gesättigten Kupfernitratlösung werden 0,2 ml 10%ige Salpetersäure gegeben und mit 95%igem Methanol auf 100 ml aufgefüllt. Mit dieser Lösung werden die Chromatogramme von beiden Seiten gleichmäßig bis zum völligen Umschlag des Farbtones von Violett nach Lachs- bis Ziegelrot besprüht. Die Elution der ausgeschnittenen Farbflecke erfolgt mit 5 ml Methanol, die Extinktion wird bei 505 mμ gemessen.

c) Anfärben in zwei Stufen: Zur Bestimmung von Cystein, Histidin und Methionin werden die mit Ninhydrinlösung durchtränkten Papierstreifen nach dem Wegtrocknen des Butanols so lange im Trockenschrank belassen, bis die Farbflecke gerade sichtbar werden. Die ausgeschnittenen Flecke werden sodann in Eprouvetten, die bei 5 und 10 ml eine Marke haben, mit 0,5 ml 1%iger Ninhydrinlösung in Phosphatpuffer vom $p_H = 7$ versetzt und 4 ml über Alkali dest. n-Butanol zugesetzt. Die Eprouvetten werden 20 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt und dann unter der Wasserleitung rasch abgekühlt. Je nach der Intensität der Färbung füllt man mit Methanol bis zur 5- oder 10-ml-Marke auf. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 570 mμ. In allen Fällen erfolgt die Auswertung unter Beziehung auf die Vergleichslösungen auf graphischem Wege.

Das zur Untersuchung verwendete Kartoffeleiweiß hatte einen Rohproteingehalt ($N \cdot 6{,}25$) von 76,9%. Die Verluste während der Hydrolyse betrugen 3,3% des Rohproteins, so daß die gefundenen Aminosäuregehalte auf einen Rohproteingehalt von 74,4% bezogen wurden.

Von den zahlreichen angefertigten Chromatogrammen sind zur näheren Erläuterung zwei (Abb. 1 und 2) wiedergegeben*. Als Verteilungs-

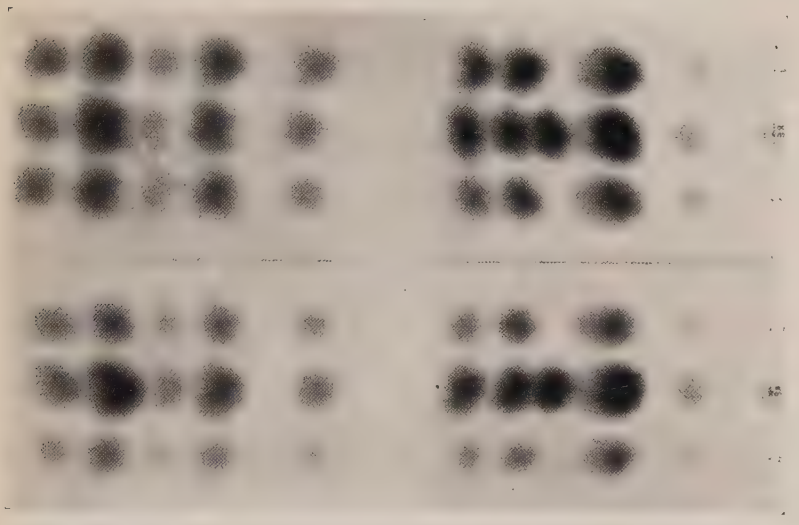


Abb. 1. Quantitatives Papierchromatogramm mit Phenol $p_H = 1{,}0$ (Auswertung Tabelle 3)

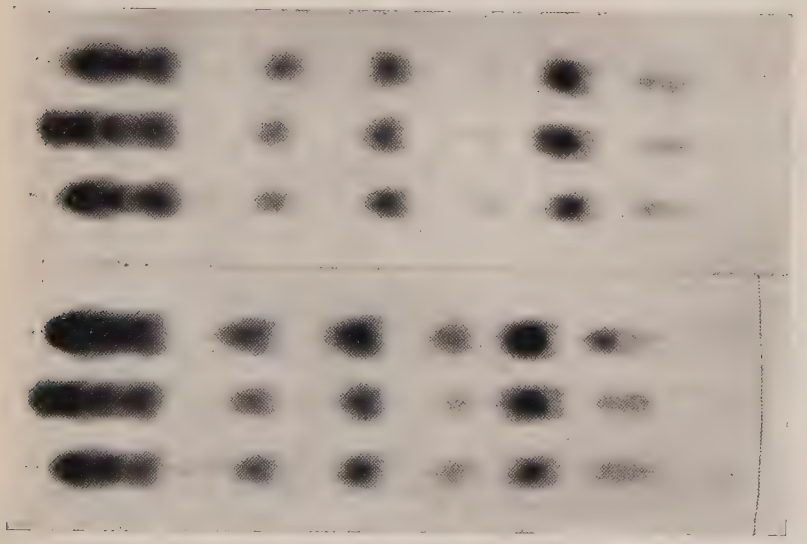


Abb. 2. Quantitatives Papierchromatogramm mit m-Kresol $p_H = 8{,}4$ (Auswertung Tabelle 4)

medium diente in dem einen Fall Phenol vom $p_H = 1{,}0$, im anderen m-Kresol vom $p_H = 8{,}4$. Aus Tabelle 3 und 4 sind die eingesetzten

* Die photographischen Aufnahmen verdanke ich der Film- und Lichtbildstelle des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft in Wien.

Mengen sowie die Extinktionswerte zu entnehmen. Die Bestimmung erfolgte in dem einen Fall über die Ninhydrin-Kupferkomplexe, im anderen wurden die Farbflecke direkt mit Methanol eluiert und nur Methionin in zwei Stufen angefärbt. Die Extinktionsmessung erfolgte mit dem Zeissschen Spektralphotometer.

Tabelle 3

Extinktionsmessung der Ninhydrin-Kupferkomplexe eines quantitativen Papierchromatogramms mit Phenol $p_H = 1{,}0$; $\lambda = 505\ m\mu$, $d = 2$ cm

Aminosäure	R_f-Wert	μg Aminosäure in 1 μl Vergleichslösung	8 μl Vergleichslösung 1	297,6 μg Kartoffelprotein	6 μl Vergleichslösung 2	4 μl Vergleichslösung 3	297,6 μg Kartoffelprotein	2 μl Vergleichslösung 4	μg Aminosäure im Kartoffelprotein	% Aminosäure im Kartoffelprotein
Cystein	0,08	0,5	0,09	0,14	0,07	0,04	0,14	0,04	6,0	2,0
Alanin	0,35	1,25	0,34	0,50	0,28	0,18	0,50	0,09	15,0	5,0
Tyrosin	0,53	2,3	0,18	0,19	0,13	0,09	0,18	0,07	18,9	6,4
Valin	0,65	2,05	0,34	0,39	0,26	0,14	0,37	0,07	18,7	6,3
Methionin	0,71	0,85	0,12	0,12	0,09	0,06	0,11	0,03	6,8	2,3
Leucin + Isoleucin	0,77	3,05	0,54	0,78	0,43	0,28	0,80	0,15	36,0	12,0
Phenylalanin	0,84	2,7	0,21	0,16	0,14	0,10	0,16	0,04	16,2	5,4

Tabelle 4

Quantitatives Papierchromatogramm mit m-Kresol $p_H = 8{,}4$
Farbflecke mit Methanol eluiert; $\lambda = 570\ m\mu$, $d = 2$ cm
Methionin in zwei Stufen angefärbt

Aminosäure	R_f-Wert		Vergleichslösung 1	148,8 μg Kartoffelprotein	Vergleichslösung 2	Vergleichslösung 3	148,8 μg Kartoffelprotein	Vergleichslösung 4	μg Aminosäure im Kartoffelprotein	% Aminosäure im Kartoffelprotein
Tyrosin	0,30	E	0,10	0,08	0,16	0,06	0,07	0,09		
		μg	13,4		20,7	8,4		11,5	9,5	6,4
Valin	0,44	E	0,19	0,18	0,34	0,21	0,16	0,16		
		μg	10,2		18,3	11,2		8,2	9,0	6,0
Methionin	0,58	E	0,20	0,17	0,37	0,27	0,18	0,17		
		μg	4,2		10,2	6,0		3,1	3,4	2,3
Leucin + Isoleucin	0,68	E	0,23	0,41	0,50	0,28	0,39	0,30		
		μg	15,3		33,8	19,0		21,2	27,2	18,3
Phenylalanin	0,80	E	0,09	0,04	0,15	0,08	0,04	0,08		
		μg	15,4		24,6	13,4		14,2	6,6	4,4

Da bei dem Chromatogramm, das mit Phenol $p_H = 1{,}0$ entwickelt wurde, die Extinktionswerte der Analysenlösung auf der Eichgeraden

zum Teil bereits außerhalb der durch die Extinktionswerte der Vergleichslösung gebildeten Punkte liegen, können diese Ergebnisse nicht als endgültig angesehen werden, sondern nur als Richtschnur für weitere Bestimmungen dienen.

Die Mittelwerte aus mehreren derartigen Chromatogrammen sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Streuung bei den einzelnen Aminosäuren betrug im Durchschnitt $\pm 5\%$. Die Gehaltszahlen sind in Prozent des Rohproteins ausgedrückt.

Tabelle 5

Aminosäuren in	Kartoffeleiweiß	Eiprotein	Milchprotein
Valin	6,4	7,3	8,4
Leucin + Isoleucin	18,2	17,2	19,8
Threonin	6,8	4,9	4,5
Arginin	5,0	6,4	4,3
Histidin	1,6	2,1	2,6
Lysin	7,5	7,2	7,5
Methionin	2,0	4,1	3,4
Tryptophan	1,6	1,5	1,6
Phenylalanin	4,9	6,3	5,7
Tyrosin	6,5		
Cystein	1,8		
Alanin	5,6		
Glycin	6,6		
Serin	5,8		

In der gleichen Tabelle sind auch die Werte für das Milch- und Eiprotein angeführt. Nach *Oser*, *Nehring* und *Mitchell* kann man aus diesen Werten für das Kartoffeleiweiß eine biologische Wertigkeit von 83,2 (bzw. 81,1) bezogen auf Milchprotein (bzw. Eiprotein) errechnen. Diese analytisch ermittelte biologische Wertigkeit steht durchaus in Einklang mit den erzielten günstigen Ergebnissen der Fütterungsversuche. Nachteilig ist jedoch nur, daß das Rohprotein des Kartoffeleiweißes nach der Pepsin-Salzsäure-Methode nur zu 64% verdaulich ist. Dementsprechend werden auch die Tiere nur einen gewissen Anteil an Aminosäuren verwerten, der in seiner prozentualen Zusammensetzung nicht der im Ausgangsmaterial entsprechen muß.

Zusammenfassung

Die Anschauung, daß die günstigen Ergebnisse der Fütterungsversuche mit Kartoffeleiweiß auf die Aminosäurezusammensetzung zurückzuführen sind, wurde durch die Eiweißbausteinanalyse bestätigt. Fütterungsversuch und errechnete biologische Wertigkeit stehen in Einklang.

Eine papierchromatographische Methode wird beschrieben, um sämtliche Aminosäuren in Futtermitteln quantitativ bestimmen zu können.

Summary

The idea that the favorable results of the feeding experiments with potato albumin are to be ascribed to the amino acid composition was confirmed by the albumin structural analysis. Feeding experiments and calculated biological activity are in agreement.

A paper chromatographic method is described for the quantitative determination of the total amino acids in foodstuffs.

Résumé

L'attribution intuitive des résultats favorables des recherches sur l'alimentation des animaux avec les matières albuminoïdes de la pomme de terre à leur composition en aminoacides a été confirmée par l'analyse des constituants des protéides. Ces résultats sont en accord avec la valeur biologique escomptée.

Description d'une méthode de chromatographie sur papier permettant la détermination quantitative de tous les aminoacides des substances fourragères.

Literatur

[1] *F. G. Fischer* und *H. Dörfel*, Biochem. Z. **324**, 544 (1953).
[2] *E. F. McFarren*, Analyt. Chemistry **23**, 168 (1951).
[3] *H. Roth* und *P. Schuster*, Angew. Chem. **52**, 149 (1939).
[4] *F. Bode*, *H. J. Hübener*, *H. Brückner* und *K. Hoeres*, Naturwiss. **39**, 524 (1952).
[5] *E. Kawerau* und *Th. Wieland*, Nature **168**, 77 (1951).
[6] *K. Nehring* und *E. Schwerdtfeger*, Pharmazie **9**, 913 (1954).
[7] *E. Kofrányi*, Z. physiol. Chem. **287**, 170 (1951).

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Universität Graz

Metallfällungen mit Naphthylarsinsäuren

Von

R. Pietsch

(Eingegangen am 4. März 1957)

Im Anschluß an die qualitative Bearbeitung der Metallfällungen von Mono- und Diphenylarsinsäuren[6], die auf grundlegende Anregungen von *F. Feigl*[2] zurückgehen, wurden die mit den beiden isomeren Naphthylarsinsäuren möglichen Metallfällungen untersucht.

Bei der Substitution der Arsensäure durch Naphthalinreste ist es grundsätzlich möglich, zwei verschiedene Substanzen herzustellen, die sich voneinander nur durch die Lage der Arsensäuregruppe gegenüber dem zweiten Kern unterscheiden. Die beiden möglichen Substanzen, die α-Naphthylarsinsäure und β-Naphthylarsinsäure wurden bereits von *Kelbe*[4] bzw. *Michaelis*[5] auf dem Wege über die entsprechenden Arsendichlorverbindungen, deren Chlorierung und nachfolgende Hydrolyse, hergestellt. Auch der Weg über die Diazotierung der entsprechenden Aminoverbindung und Umsetzung des erhaltenen Diazoniumsalzes mit Natriumarsenit ist zu einem späteren Zeitpunkt von *Hill* und *Balls*[3] bzw. *Brown*[1] eingeschlagen worden. Während nun die Schmelzpunkte der nach den beiden verschiedenen Methoden erhaltenen α-Naphthylarsinsäuren mit 197° C übereinstimmten, ergaben sich Differenzen bei den β-Naphthylarsinsäuren. Während *Michaelis*[5] einen Schmelzpunkt von 155° C für sein Produkt angab, fand *Brown*[1] einen Schmelzpunkt von nicht unter 300° C. Dieser Unterschied wird durch die Möglichkeit einer Wanderung der Arsensäuregruppe bei den relativ hohen Temperaturen bei der Herstellungsmethode nach *Michaelis* erklärt. Da *Brown* durch Untersuchung des Schmelzpunktes von Mischungen aus α- und β-Naphthylarsinsäure den Schmelzpunkt von 159° C erhalten konnte, wird diese Annahme sehr wahrscheinlich.

Um reine Substanzen für die Untersuchung der Metallfällungen zur Verfügung zu haben, wurde bei der Herstellung der benötigten α- und

β-Naphthylarsinsäure der Weg über die entsprechenden Aminoverbindungen nach den Angaben von *Hill* und *Balls* bzw. *Brown* eingeschlagen. Die erhaltenen Substanzen zeigten die in der Literatur angegebenen Eigenschaften.

Bei den einzelnen Versuchen wurden etwa 0,02-molare Lösungen verwendet, wobei die Naphthylarsinsäuren in einem etwa 15fachen Überschuß angewendet wurden.

α-Naphthylarsinsäure

In der nachfolgenden Tabelle werden die Fällungen der Säure mit den einzelnen Metallionen wiedergegeben:

Metall	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	3	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	8	nicht quantitativ
Ca^{2+}	weiß	6	quantitativ
Sr^{2+}	weiß	9	quantitativ
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	2	quantitativ
Y^{3+}	weiß	3	quantitativ
La^{3+}	weiß	3	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	3	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
V^{5+}	keine Reaktion		
Cr^{3+}	grünlich	1,5	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	keine Reaktion		
W^{6+}	keine Reaktion		
UO_2^{2+}	gelb	< 1	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Fe^{2+}	weiß	< 1	nicht quantitativ
Fe^{3+}	braun	1	quantitativ
Co^{2+}	lila	5	quantitativ
Ni^{2+}	hellgrün	5	quantitativ
Ru^{3+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Rh^{3+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Pd^{2+}	braun	4	nicht quantitativ
Ir^{4+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Pt^{4+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Cu^{2+}	hellgrün	3,5	quantitativ
Ag^{+}	weiß	3,5	quantitativ
Au^{3+}	Farbänderung		
Zn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	3	quantitativ
Hg^{+}	weiß	< 1	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	2	quantitativ

Fortsetzung der Tabelle

Metall	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
In^{3+}	weiß	< 1	quantitativ
Tl^{+}	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	< 1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Pb^{2+}	weiß	3	quantitativ
Bi^{3+}	weiß	< 1	quantitativ

Alle Fällungen zeigen mehr oder weniger die den Metallionen entsprechenden Farben, sind mit Ausnahme von Ca und Sr, die manchmal kristallin auftreten, durchwegs flockig und mit Ausnahme von Cr^{3+} und Hg^{+} gut filtrierbar.

β-Naphthylarsinsäure

Die bei der Einwirkung der wäßrigen Lösung der Säure auf Metallionen erhaltenen Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt:

Metall	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	1	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	4	quantitativ
Ca^{2+}	weiß	5	quantitativ
Sr^{2+}	weiß	4	quantitativ
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	1	quantitativ
Y^{3+}	weiß	1	quantitativ
La^{3+}	weiß	1,5	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	< 1	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
V^{5+}	keine Reaktion		
Cr^{3+}	grünlichweiß	< 1	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	keine Reaktion		
W^{6+}	keine Reaktion		
UO_2^{2+}	weiß	< 1	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	2,5	quantitativ
Fe^{2+}	grünlichweiß	< 1	quantitativ
Fe^{3+}	gelblichweiß	< 1	quantitativ
Co^{2+}	lila	3	quantitativ
Ni^{2+}	gelbgrün	3	quantitativ
Ru^{3+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Rh^{3+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Pd^{2+}	braun	2	nicht quantitativ
Ir^{4+}	sauer, keine Reaktion, alkalisch Aufhellung		
Pt^{4+}	alkalisch Farbänderung		
Cu^{2+}	grünlichweiß	2	quantitativ

Fortsetzung der Tabelle

Metall	Farbe des Niederschlages	p_H bei Fällungsbeginn	Bemerkung
Ag^+	weiß	3	quantitativ
Au^{3+}	Farbänderung		
Zn^{2+}	weiß	2,5	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	2,5	quantitativ
Hg^+	weiß	< 1	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	2	quantitativ
In^{3+}	weiß	< 1	quantitativ
Tl^+	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	< 1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Pb^{2+}	weiß	1	quantitativ
Bi^{3+}	weiß	< 1	quantitativ

Die Niederschläge sind mit Ausnahme von Mg, Ca und Sr, die manchmal kristallin ausfallen, durchwegs flockig und gut filtrierbar. Erwähnt soll noch werden, daß bei stärkeren Abweichungen von den angegebenen Konzentrationen auch Änderungen im Beginn des Ausfallens der einzelnen Metallionen mit den Säuren eintreten.

p_H	Phenylarsinsäure	α-Naphthylarsinsäure	β-Naphthylarsinsäure
			Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{1+}, In^{3+}
		Bi^{3+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Ti^{4+}	Sn^{2+}, Sn^{4+}, Bi^{3+}, Ce^{3+}
		Zr^{4+}, Th^{4+}, UO_2^{2+}	Ti^{4+}, Zr^{4+}, Th^{4+}, Cr^{3+}
	Zr^{4+}, Th^{4+}, Bi^{3+}	Hg^+, In^{3+}, (Fe^{2+})	UO_2^{2+}
1	Ti^{4+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^+	Fe^{3+}	Be^{2+}, Al^{3+}
	Hg^{2+}, In^{3+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}		Y^{3+}, Pb^{2+}
	UO_2^{2+}	Cr^{3+}	La^{3+}
2	Al^{3+}, Y^{3+}, La^{3+}	Al^{3+}, Hg^{2+}	Cu^{2+}, Hg^{2+}
	Ce^{3+}, Cu^{2+}		(Pd^{2+})
	Cr^{3+}, Zn^{2+}		Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}
3	Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}	Y^{3+}, La^{3+}, Ce^{3+}, Mn^{2+}	Co^{2+}, Ni^{2+}, Ag^+
		Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Be^{2+}	
		Cu^{2+}, Ag^+	
4	Ag^+, Pb^{2+}	(Pd^{2+})	Mg^{2+}, Sr^{2+}
5	Ni^{2+}	Co^{2+}, Ni^{2+}	Ca^{2+}
6	Be^{2+}	Ca^{2+}	
7			
	Mg^{2+}		
8		(Mg^{2+})	
9		Sr^{2+}	

Die vorstehende Vergleichstabelle bringt die einzelnen Metallionen zusammengestellt nach dem p_H-Wert beim Beginn des Ausfallens mit

den betreffenden Säuren. Zu Vergleichszwecken ist auch die Phenylarsinsäure, deren Reaktionen mit den Metallionen bereits beschrieben wurde[6], in die Übersicht aufgenommen worden.

Wenn man nur die beiden isomeren Naphthylarsinsäuren vergleicht, so kann man ganz allgemein eine Verschiebung des Fällungsbeginnes nach saureren Werten mit der β-Säure feststellen. Dies trifft besonders auf die Metalle Cr^{3+}, Be^{2+}, Al^{3+}, Y^{3+}, La^{3+}, Ce^{3+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Pd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} und Mg^{2+} zu, während bei den Metallen Bi^{3+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Ti^{4+}, Zr^{4+}, Th^{4+}, UO_2^{2+}, Hg^{+}, Hg^{2+}, In^{3+} und Fe^{2+}, Fe^{3+} kein wesentlicher Unterschied in der Wirkung der beiden Isomeren zu verzeichnen ist. Bemerkenswert ist ferner, daß mit der β-Naphthylarsinsäure auch die Metallionen Fe^{2+} und Mg^{2+} quantitativ gefällt werden können, was mit der α-Naphthylarsinsäure nicht gelingt.

Beim Übergang von Phenylarsinsäure zu α-Naphthylarsinsäure bleibt der Fällungsbeginn von Zr^{4+}, Th^{4+}, Bi^{3+}, Ti^{4+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+} und Ni^{2+} praktisch gleich. Bei den Metallionen UO_2^{2+}, Cr^{3+}, Pb^{2+}, Be^{2+}, Ca^{2+} und Sr^{2+} verschiebt er sich zu saueren, bei den Ionen Hg^{2+}, Y^{3+}, La^{3+}, Ce^{3+}, Cu^{2+} und Co^{2+} zu etwas alkalischeren Werten.

Wenn sich der Übergang von Phenylarsinsäure zu β-Naphthylarsinsäure vollzieht, so bleibt für die Metalle Zr^{4+}, Th^{4+}, Bi^{3+}, Ti^{4+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{+}, In^{3+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} und Cd^{2+} der Fällungsbeginn praktisch gleich, während er für UO_2^{2+}, Y^{3+}, Ce^{3+}, Be^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, La^{3+} und Ca^{2+} zu stärker sauren Werten, und nur für Hg^{2+} zu einem etwas alkalischeren Wert verschoben wird.

Zusammenfassung

Es werden die Fällungseigenschaften von α- und β-Naphthylarsinsäure qualitativ untersucht und die Lage des Fällungsbeginnes der einzelnen Metallionen mit den betreffenden Säuren angegeben. Die durch die Stellung der Arsensäuregruppe in den beiden Isomeren bedingten Unterschiede im Verhalten gegenüber Metallionen werden aufgezeigt und auch mit dem Verhalten der Phenylarsinsäure verglichen.

Summary

A qualitative study was made of the precipitation characteristics of α- and β-naphthylarsinic acids. The point of the beginning of the precipitation of the individual metal ions with the respective acids is given. The differences in the behavior toward metal ions resulting from the position of the arsinic acid group in the two isomers is shown and also compared with the behavior of phenylarsinic acid.

Résumé

Recherches qualitatives concernant les propriétés des acides α et β naphtylarsoniques comme réactifs de précipitation commençante des ions métalliques individuels par ces acides.

L'auteur montre les différences de comportement des deux acides vis-à-vis des ions métalliques résultant de la position différente du groupement acide arsonique dans les deux isomères. Il les compare en outre au comportement de l'acide phénylarsonique.

Literatur

[1] *H. P. Brown*, Trans. Kansas Acad. Sci. **42**, 209 (1939).
[2] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. New York: Academic Press. 1949.
[3] *A. E. Hill* und *A. K. Balls*, J. Amer. Chem. Soc. **44**, 2051 (1922); zitiert nach Chem. Zbl. **1923**, I, 75.
[4] *W. Kelbe*, Ber. dtsch. chem. Ges. **11**, 1503 (1878).
[5] *A. Michaelis*, Ann. Chem. **320**, 344 (1902).
[6] *R. Pietsch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 161.

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Universität Graz

Fällungsreaktionen mit 2,3- und 3,4-Dimethylphenylarsinsäure

Von

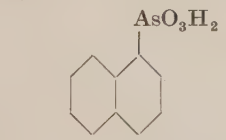
R. Pietsch

Mit 1 Abbildung

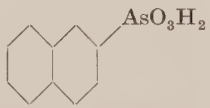
(Eingegangen am 27. März 1957)

Bei der Untersuchung der Eigenschaften von α- und β-Naphthylarsinsäure[4] gegenüber Metallionen wurde im Vergleich mit den fällenden Eigenschaften der Phenylarsinsäure festgestellt, daß zwar entsprechend der von *Feigl*[3] entwickelten Anschauung über die Gruppenwirkung große Ähnlichkeiten zwischen den beiden Isomeren bestehen, jedoch anderseits auch große Unterschiede in den p_H-Werten des Fällungsbeginnes einiger Metallionen auftreten.

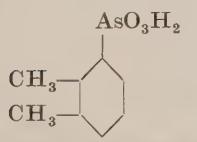
Um nun der Frage näher zu kommen, ob dieser Unterschied durch die Lage der Arsensäuregruppe gegenüber dem zweiten Kern, also die Besetzung bestimmter Stellen des die Arsensäuregruppe tragenden Kernes bewirkt wird, wurden die beiden Dimethylphenylarsinsäuren hergestellt.



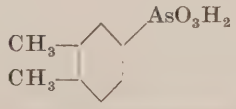
α-Naphthylarsinsäure



β-Naphthylarsinsäure



2,3-Dimethylphenylarsinsäure



3,4-Dimethylphenylarsinsäure

Da keine Literatur bezüglich der Herstellung dieser beiden isomeren Dimethylphenylarsinsäuren zugänglich war, soll deren Herstellung hier kurz beschrieben werden.

2,3-Dimethylphenylarsinsäure

Diese Säure wurde auf dem Wege einer Bartschen Reaktion aus 2,3-Dimethylanilin hergestellt. 12,1 g 2,3-Dimethylanilin wurden in 500 ml Wasser eingerührt und mit 35 ml Salzsäure ($d = 1{,}126$) in Lösung gebracht. Nun wurde wie üblich mit einer Lösung von 7 g Natriumnitrit in 100 ml Wasser unter Eiskühlung diazotiert. 11,6 g arsenige Säure wurden mit 15,4 g Ätznatron in wenig Wasser gelöst und sodann auf 1500 ml verdünnt. In diese Lösung wurde nach gutem Kühlen die Diazoniumlösung eingegossen. Die Mischung der Lösungen wurde nach vorübergehender Rotfärbung unter Gasentwicklung und Trübung gelb und wurde stehengelassen bis nach etwa 2 Stunden mit β-Naphthol keine Diazoniumverbindung mehr nachgewiesen werden konnte. Die alkalische Lösung wurde auf etwa 400 ml eingeengt, mit Salzsäure neutralisiert, mit Tierkohle aufgekocht und filtriert. Das fast farblose Filtrat wurde mit Salzsäure bis zum Umschlag von Kongorot versetzt. Die Säure kristallisierte beim Erkalten in feinsten Nadeln, die sich zu Drusen vereinigten, aus. Aus der Mutterlauge ließen sich durch weiteres Einengen noch beträchtliche Mengen der Säure gewinnen. Sie ist aus Wasser leicht umzukristallisieren und wird eventuell auch mit Tierkohle ausgekocht.

Die Kristallnadeln zeigen unter dem Heiztischmikroskop keinen Schmelzpunkt, sondern beginnen ab etwa 200° C zu sublimieren, wobei sich größere Aggregate verkleinern und einzelne Nadeln langsam verschwinden.

Die Analyse ergab:

Berechnet für $(C_6H_3)_2CH_3AsO_3H_2$: As 32,55%.
Gefunden: As 32,60%.

3,4-Dimethylphenylarsinsäure

Es wurde nach der gleichen Arbeitsmethode verfahren wie bei der Herstellung von 2,3-Dimethylphenylarsinsäure. Da jedoch das hier verwendete 3,4-Dimethylanilin flüssig ist, erübrigte sich das Erwärmen beim Versetzen mit Salzsäure.

Die Säure kristallisiert in feinen weißen, dicht gepackten Nadeln. Weiteres Eindampfen der Mutterlauge wie bei dem 2,3-Isomeren führt hier zu keinem weiteren Anfall von Substanz.

Die Säure zeigt unter dem Mikroskop keinen Schmelzpunkt. Bei etwa 110° wandelt sie sich sichtlich in eine andere Form — eventuell das Anhydrid — um, die jedoch bis 250° C nicht schmilzt.

Die mehrmals aus Wasser umkristallisierte Säure ergab bei der Analyse:

Berechnet für $(CH_3)_2C_6H_3AsO_3H_2$: As 32,55%.
Gefunden: As 32,52%.

Wie im Falle der Naphthylarsinsäuren wurde bei den Fällungsversuchen mit etwa 0,02-molaren wäßrigen Lösungen und einem etwa 15fachen Überschuß an Säure gearbeitet.

2,3-Dimethylphenylarsinsäure

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Fällungsergebnisse mit den einzelnen Metallionen zusammengestellt.

Tabelle 1

Metallion	Farbe der Fällung	p_H des Fällungsbeginnes	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	3	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	8,5	nicht quantitativ
Ca^{2+}	weiß	7	nicht quantitativ
Sr^{2+}	keine Reaktion		
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	3,5	quantitativ
Y^{3+}	weiß	2,5	quantitativ
La^{3+}	weiß	3	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	3	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	1	quantitativ
V^{5+}	keine Reaktion		
Cr^{3+}	grün	3	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	keine Reaktion		
W^{6+}	keine Reaktion		
UO_2^{2+}	gelblich	1	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	3,5	quantitativ
Fe^{2+}	grünlich	3	quantitativ
Fe^{3+}	gelb	1	quantitativ
Co^{2+}	violett	4,5	quantitativ
Ni^{2+}	gelbgrün	5	quantitativ
Ru^{3+}	keine Reaktion		
Rh^{3+}	keine Reaktion		
Pd^{2+}	braun	4,5	nicht quantitativ
Ir^{4+}	keine Reaktion in verd. Lösung		
Pt^{4+}	keine Reaktion		
Cu^{2+}	weißlichblau	4	quantitativ
Ag^{1+}	weiß	4	quantitativ
Au^{3+}	keine Reaktion		
Zn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	3	quantitativ
Hg^{1+}	gelblich	1	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	1	quantitativ
In^{3+}	weiß	2	quantitativ
Tl^{1+}	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	1	quantitativ
Pb^{2+}	weiß	4	quantitativ
Bi^{3+}	weiß	1	quantitativ

Die Niederschläge sind alle flockig und gut filtrierbar. Ausnahmen bilden nur Ca^{2+} und Co^{2+}, die manchmal pulverig ausfallen, sowie Sn^{2+}, das schlecht filtrierbar ist. Die Farben entsprechen durchaus den jeweiligen Metallionen und weichen von den Erwartungen kaum ab.

3,4-Dimethylphenylarsinsäure

Die mit dieser Säure erhaltenen Fällungsergebnisse zeigt die Tabelle 2.

Tabelle 2

Metallion	Farbe der Fällung	p_H des Fällungsbeginnes	Bemerkung
Be^{2+}	weiß	3,5	quantitativ
Mg^{2+}	weiß	4	quantitativ
Ca^{2+}	weiß	6	nicht quantitativ
Sr^{2+}	keine Reaktion		
Ba^{2+}	keine Reaktion		
Al^{3+}	weiß	2,5	quantitativ
Y^{3+}	weiß	2,5	quantitativ
La^{3+}	weiß	3	quantitativ
Ce^{3+}	weiß	2,5	quantitativ
Ti^{4+}	weiß	1	quantitativ
Zr^{4+}	weiß	< 1	quantitativ
Th^{4+}	weiß	1	quantitativ
V^{5+}	keine Reaktion in verd. Lösung		
Cr^{3+}	grün	2,5	quantitativ
Cr^{6+}	keine Reaktion		
Mo^{6+}	keine Reaktion		
W^{6+}	keine Reaktion		
UO_2^{2+}	hellgelb	1	quantitativ
Mn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Fe^{2+}	grünlich	2,5	quantitativ
Fe^{3+}	gelb	1	quantitativ
Co^{2+}	violett	3	quantitativ
Ni^{2+}	grün	4	quantitativ
Ru^{3+}	keine Reaktion		
Pd^{2+}	braun	4	nicht quantitativ
Ir^{4+}	keine Reaktion in verd. Lösung		
Pt^{4+}	keine Reaktion		
Cu^{2+}	hellblau	2,5	quantitativ
Ag^{1+}	weiß	3,5	quantitativ
Au^{3+}	keine Reaktion		
Zn^{2+}	weiß	3	quantitativ
Cd^{2+}	weiß	2,5	quantitativ
Hg^{1+}	weiß	1	quantitativ
Hg^{2+}	weiß	2	quantitativ
In^{3+}	weiß	3	quantitativ
Tl^{1+}	keine Reaktion		
Sn^{2+}	weiß	1	quantitativ
Sn^{4+}	weiß	1	quantitativ
Pb^{2+}	hellgelb	3	quantitativ
Bi^{3+}	weiß	1	quantitativ

Die Niederschläge sind mit Ausnahme von Sn^{2+} alle gut filtrierbar. Die Fällungen von Ca^{2+} und Mg^{2+} fallen manchmal pulverig bis kristallin

aus; alle anderen Niederschläge sind durchwegs flockig. Die Tabelle 3 bringt die Gegenüberstellung der p_H-Werte des Fällungsbeginns von Metallionen mit den beiden isomeren Dimethylphenylarsinsäuren.

Tabelle 3

pH	2,3-Dimethylphenylarsinsäure	3,4-Dimethylphenylarsinsäure
	Zr^{4+}	Zr^{4+}
1	Ti^{4+}, Th^{4+}, UO_2^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{1+} Hg^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Bi^{3+}	Ti^{4+}, Th^{4+}, UO_2^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{1+} Sn^{2+}, Sn^{4+}, Bi^{3+}
2	In^{3+}	Hg^{2+}
	Y^{3+}	Cu^{2+}, Al^{3+}, Y^{3+}, Ce^{3+}, Cr^{3+}, Fe^{2+}
3	Cd^{2+}, Be^{2+}, La^{3+}, Ce^{2+}, Fe^{2+} Zn^{2+}, Cr^{3+}	Cd^{2+} La^{3+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, In^{3+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}
	Al^{3+}, Mn^{2+}	Be^{2+}, Ag^{1+}
4	Cu^{2+}, Ag^{1+}, Pb^{2+}	Mg^{2+}, Ni^{2+}, (Pd^{2+})
	Co^{2+}, (Pd^{2+})	
5	Ni^{2+}	
6		(Ca^{2+})
7	(Ca^{2+})	
8		
	(Mg^{2+})	

Selbstverständlich treten auch bei diesen Fällungen Verschiebungen in der Lage des Fällungsbeginns auf, wenn die Konzentrationen oder die Versuchsbedingungen wesentlich verändert werden.

Bei den Metallionen Zr^{4+}, Ti^{4+}, Th^{4+}, UO_2^{2+}, Fe^{3+}, Bi^{3+}, Hg^{+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Y^{3+}, La^{3+} und Zn^{2+} ist überhaupt kein Unterschied im Fällungsbeginn der betreffenden Ionen mit den beiden isomeren Dimethylphenylarsinsäuren festzustellen. Bei den Ionen Cd^{2+}, Ce^{3+}, Cr^{3+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ag^{1+}, Pd^{2+} und Be^{2+} ist praktisch ebenfalls keine Veränderung festzustellen. Lediglich bei den Ionen Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} und Al^{3+} ist mit der 3,4-Dimethylphenylarsinsäure in stärker saurem Gebiet eine Fällung zu erreichen als mit der 2,3-Dimethylphenylarsinsäure. Die stärkste Verschiebung zeigt in diesem Falle das Mg^{2+}, das außerdem mit dem 3,4-Isomeren quantitativ fällbar ist. Ein Fällungsbeginn im stärker alkalischen Gebiet wäre bei dem 3,4-Isomeren gegenüber der 2,3-Verbindung nur bei Hg^{2+} und In^{3+} feststellbar.

Vergleich der Reaktionen der beiden Dimethylphenylarsinsäuren mit den beiden isomeren Naphthylarsinsäuren

Einleitend zeigt eine Tabelle die aus der Literatur ermittelten Konstanten der Substanzen, um eventuelle wesentliche Unterschiede zwischen

den jeweiligen Isomeren sichtbar zu machen. Die Anzahl der Atome pro Molekül (= 23) ist bei allen vier Substanzen gleich groß.

Tabelle 4

	Dimethylphenylarsinsäure		Naphthylarsinsäure	
	2,3-	3,4-	α	β
Molekulargewicht	230,1	230,1	252,1	252,1
Löslichkeit in H_2O bei 20° C mg/l	550	2850	780	390
Dissoziationskonst.:				
fremde Messung[5] ...	—	—	$2{,}2 \cdot 10^{-4}$	—
eigene Messung.....	$2{,}0 \cdot 10^{-4}$	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	$2{,}9 \cdot 10^{-4}$	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$

Zu den von mir gemessenen Dissoziationskonstanten soll bemerkt werden, daß sie nur Vergleichswerte darstellen, an die keine allzu großen Anforderungen hinsichtlich ihrer Genauigkeit gestellt werden dürfen. Sie wurden nach der Methode von *Auerbach* und *Smolczyk*[1] über den Punkt der Halbneutralisation ermittelt, welche Methode streng nur für einbasische Säuren gilt. Da die zweiten Dissoziationskonstanten der Arsinsäuren um rund fünf Zehnerpotenzen kleiner sind[5], ist eine wesentliche Beeinflussung von K_1 durch K_2 nicht zu erwarten. Im Zweifelsfalle ist der hier angegebene Wert für K mit K_1 identisch.

Zu der Tabelle ist ferner zu sagen, daß zwischen den Dissoziationskonstanten einerseits der 2,3-Dimethylphenylarsinsäure und ihrem 3,4-Isomeren und anderseits der α- und β-Naphthylarsinsäure nur ein geringer Unterschied besteht. Hingegen sind die Unterschiede in den Löslichkeiten der beiden jeweiligen Isomeren sehr beträchtlich, besonders im Falle der Dimethylphenylarsinsäuren, die noch dazu genau das umgekehrte Bild der Verhältnisse bei den Naphthylarsinsäuren darstellen.

Bei Vergleich des p_H der Fällungsbeginne der einzelnen Metallionen bei den beiden isomeren Dimethylphenylarsinsäuren mit jenen, die mit den Naphthylarsinsäuren erhalten wurden, lassen sich vier Gruppen von Metallionen unterscheiden, die gleichsinnige Veränderungen zeigen, wenn man von der 2,3-Dimethylphenylarsinsäure zum 3,4-Isomeren bzw. von der α-Naphthylarsinsäure zur β-Naphthylarsinsäure übergeht.

Gruppe I: Metallionen, deren Fällungsbeginn stets gleichbleibt, gleichgültig mit welcher der vier Säuren die Fällung erfolgt. Dazu gehört: Zr^{4+}, Th^{4+}, Ti^{4+}, UO_2^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{1+}, Sn^{2+}, Sn^{4+} und Bi^{3+}.

Gruppe II: Metallionen, deren Fällungsbeginn bei den Dimethylphenylarsinsäuren bei gleichem p_H erfolgt, der sich aber beim Übergang von der α- zur β-Naphthylarsinsäure zu kleineren Werten verschiebt. In diese Gruppe gehören: Ag^{1+}, Be^{2+}, Pd^{2+}, Mn^{2+}, Cr^{3+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ce^{3+}, Y^{3+}, La^{3+}.

Gruppe III: Metallionen, die ihren Fällungsbeginn sowohl beim Übergang von der 2,3- zur 3,4-Dimethylphenylarsinsäure als auch von der α- zur β-Naphthylarsinsäure in stärker saurem Medium zeigen. Hierher gehören: Cu^{2+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}.

Gruppe IV: Metallionen, die beim Übergang von der 2,3- zur 3,4-Dimethylphenylarsinsäure ihren Fällungsbeginn nach alkalischeren Bereichen verlegen, während er beim Übergang von der α- zur β-Naphthylarsinsäure gleichbleibt. In diese Gruppe gehören Hg^{2+} und In^{3+}.

Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht dieser Verschiedenheiten.

Tabelle 5

p_H des Fällungsbeginnes	Übergang von			
	α- zur β-Form		2,3- zur 3,4-Form	
Abfallend	II	III	III	
Gleichbleibend ...	I	IV	I	II
Ansteigend	—		IV	

Wenn man von den Dimethylphenylarsinsäuren zu den Naphthylarsinsäuren übergeht, ist also bei den Metallen der Gruppe II und IV eine Verschiebung des Fällungsbeginns der Metallionen nach kleineren p_H-Werten merkbar.

Interessant ist jedoch, daß in Gruppe I eine Reihe von Metallen vorliegt, die mit dem Arsensäurerest so spezifisch reagieren, daß die Wirkung des zweiten kondensierten Kernes im Falle der Naphthylarsinsäuren bzw. der beiden Methylgruppen in entsprechender Stellung, im Sinne einer p_H-Minderung nicht mehr erkennen lassen. Unter Umständen kann eine solche Minderung schon vorhanden sein, kommt aber in dieser Aufstellung dadurch nicht mehr zum Ausdruck, daß alle Metalle der Gruppe I bereits in stark saurem Gebiet ausfallen. Eine mögliche Verschiebung müßte sich in den Fällungseigenschaften der Säuren auf die betreffenden Metalle in verschieden konz. Säuren wiederspiegeln.

Die Gruppe III scheint Metallionen zu umfassen, die einerseits eine mehr oder weniger große Affinität zur Arsensäuregruppe haben, anderseits jedoch auch durch die Lage benachbarter Gruppen stark beeinflußt werden. Ob im Falle der Naphthylarsinsäuren noch zusätzlich ein durch den vergrößerten aromatischen Teil hervorgerufener Effekt vorliegt, kann aus dieser Zusammenstellung nicht entnommen werden.

Die Ähnlichkeit im Verhalten der Dimethylphenylarsinsäuren und der Naphthylarsinsäuren gegen Metalle der Gruppe III wird auch durch die Fällungskurven dieser Metalle bestätigt.

Zur Aufnahme der Fällungskurven, die im Prinzip eine nephelometrisch und durch p_H-Messungen kontrollierte Neutralisation einer sauren Lösung

von Metallionen und Säuren darstellt[2], wurden stets Lösungen mit gleicher molarer Säure- und Metallionenkonzentration verwendet, so daß die erhaltenen Absorptions-p_H-Kurven miteinander vergleichbar sind. Dies gilt streng nur für den Fällungsbeginn, während die mit den verschiedenen Substanzen erhaltenen maximalen Absorptionen bzw. Trübungen nur unter den Isomeren vergleichbar sind. Die im folgenden angegebenen Werte zeigen die mit den Metallen der Gruppe III erhaltenen Ergebnisse der Fällungskurven:

Tabelle 6

Metallion	α-Naphthylarsinsäure		β-Naphthylarsinsäure		2,3-Dimethylphenylarsinsäure		3,4-Dimethylphenylarsinsäure	
	p_H bei Fällungsbeginn	% max. Absorption	p_H bei Fällungsbeginn	% max. Absorption	p_H bei Fällungsbeginn	% max. Absorption	p_H bei Fällungsbeginn	% max. Absorption
Mg	8	0	4	95	8,5	8	4	69
Ca	6	0	5	75	7	8	6	29
Ni	5	83	3	82	5	77	4	73
Co	5	84	3	88	4,5	87	3	87
Pb	3	90	1	88	4	73	3	81
Cu	3,5	63	2	74	4	40	2,5	94
Al	2	12	1	86	3,5	73	2,5	89

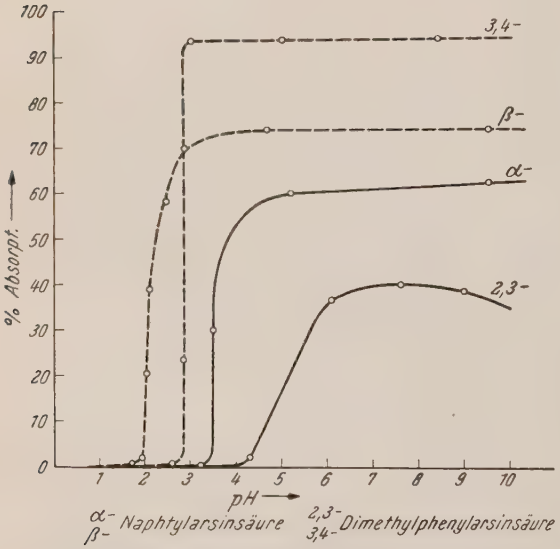


Abb. 1. Fällungskurven von Kupfer mit den isomeren Dimethylphenylarsinsäuren und Naphthylarsinsäuren

Für den Fall des Cu-Ions gibt zur besseren Anschaulichkeit Abb. 1 die Fällungskurven wieder.

Aus den Werten der Tabelle sieht man deutlich, daß zwar bei allen angeführten Metallen eine Verlagerung des Fällungsbeginnes in ein Gebiet kleinerer p_H-Werte, jedoch nicht in jedem Fall auch eine Erhöhung der maximalen Absorption vorliegt, wenn von der 2,3- in die 3,4-Stellung bzw. von der α- in die β-Stellung übergegangen wird. Aber sowohl bei den Naphthylarsinsäuren wie bei den Dimethylphenylarsinsäuren sind es immer die gleichen Metalle, bei denen eine Erhöhung der Absorption eintritt. Auch ist es in beiden Fällen das

Magnesium, das die größte Absorptionszunahme aufweist. Eine Unstimmigkeit in dieser Hinsicht liegt nur bei Blei vor.

Die Verhältnisse bei den Metallen der Gruppe II liegen ähnlich.

Über den Grund der Absorptionszunahme beim Übergang von dem einen Isomeren zum anderen läßt sich aus den Kurven nichts entnehmen. Möglicherweise handelt es sich um mehr oder weniger stark basische Salze.

Zusammenfassung

Es werden die Reaktionen der 2,3- und 3,4-Dimethylphenylarsinsäure mit einer Reihe von Metallionen beschrieben und die p_H-Werte des jeweiligen Fällungsbeginnes mitgeteilt. Die Unterschiede bei Verwendung der beiden Isomeren werden aufgezeigt.

Ferner werden die analytischen Reaktionen der genannten Dimethylphenylarsinsäuren mit denen der schon früher bearbeiteten α- und β-Naphthylarsinsäuren verglichen. Einige gemeinsame Erscheinungen analytischer Natur, die auf Konstitutionsähnlichkeiten beruhen, werden ebenso wie die entsprechenden Unterschiede der Substanzen zusammengestellt und diskutiert.

Summary

The reactions of 2,3- and 3,4-dimethylphenylarsinic acids with a number of metal ions are described. The p_H values of the precipitation thresholds are given. The differences in the use of the two isomers are pointed out.

The analytical reactions of these reagents are compared with those of the previously described α- and β-naphthylarsinic acids. Several common phenomena of analytical nature, which rest on constitutional similarities, are compiled and discussed, and likewise the corresponding differences.

Résumé

Description des réactions des acides diméthyl 2,3-phénylarsoniques et diméthyl 3,4-phénylarsoniques avec une série d'ions métalliques et indication des p_H respectifs de commencement de précipitation.

Mise en évidence des différences qui se manifestent entre les deux isomères lors de leur emploi.

Les réactions analytiques des deux acides diméthylphénylarsoniques sont en outre comparées à celles des acides α et β naphtylarsoniques antérieurement étudiés. L'auteur résume et discute quelques comportement analytiques communs de ces substances, reposant sur des similitudes de constitution, ainsi que les différences correspondantes.

Literatur

[1] *F. Auerbach* und *E. Smolczyk*, Z. physik. Chem. **110**, 65 (1924).

[2] *M. Borrel* und *R. A. Paris*, Analyt. Chim. Acta **6**, 389 (1952).

[3] *F. Feigl*, Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions. New York: Academic Press. 1949.

[4] *R. Pietsch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 699.

[5] *D. Pressmann* und *D. H. Brown*, J. Amer. Chem. Soc. **65**, 540 (1943).

School of Criminology, University of California, Berkeley

Improved Technique for Toxicological Extractions*

By

Paul L. Kirk and **Charlotte L. Brown**

With 2 Figures

(Received February 2, 1957)

The extraction of poisonous materials and drugs from physiological materials, such as blood and organs, as a preliminary to their identification or determination for toxicological purposes continues to be time consuming and laborious. Several improvements[1–3] in the original method of *Stas* and *Otto* have been described, and some virtually new and different approaches have been recommended[4,5], but all of these also are troublesome from the technical standpoint and may or may not be satisfactory for a particular purpose.

Nearly all extraction procedures currently used in toxicology make use of successive extractions from acid and alkaline solution with organic solvents, such as ether or chloroform, to remove acidic and basic poisons or drugs. The extraction is ordinarily performed in separatory funnels. This requires that phases be drawn off into various beakers and flasks and gives rise to a large number of individual fractions, each of which must receive attention. Since certain lipoidal material, such as neutral fat, steroids and phospholipides, are invariably present in toxicological specimens and pass into the extracts, re-extraction of evaporated fractions by aqueous solvents is often necessary for purification, and this adds to the procedure another necessary and laborious step which should be avoided.

A further object was to obtain, without evaporation, a reasonably concentrated solution which would be suited for continuous electrophoretic separation[6] and electrophoretic or chromatographic identification.

* Dedicated to Prof. *H. Lieb* on the occasion of his 70th birthday. Aided by grants from the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service, and the Research Committee, University of California.

These techniques require small samples because of the inability of the paper to accept large volumes of solution.

In the effort to achieve these desirable results, two new extractors were developed and tested. With them, it was found possible to obtain a considerable saving of time and manipulation; to concentrate the material very significantly without evaporation; and to get good yields of numerous materials in relatively pure form, even when several steps of the conventional process were omitted entirely. Not all of the poisons and drugs of interest were tested, nor were all possible or desirable variations of procedure. This is said partly for the reason that the versatile nature of device and technique may lead to numerous unexpected uses and modifications.

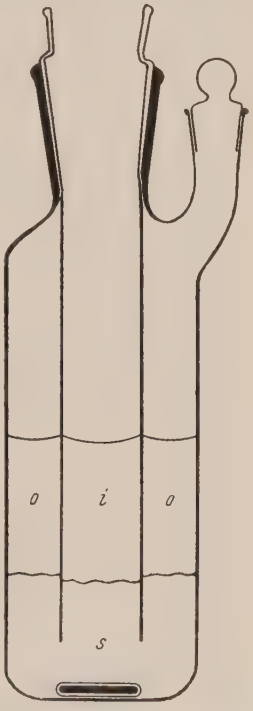


Fig. 1. Extractor for Heavier-Than-Water Solvents. One half Size

Apparatus and Procedure

The extractors that were designed and built operated on the principle of a continuous liquid-liquid double extraction system. The most satisfactory design is shown in Fig. 1. It consists of a container with a ground joint at the top through which a concentric open tube extends nearly to the bottom. It also has a side arm with ground stopper through which samples may be inserted or withdrawn. Immiscible solvent that is heavier than water is introduced first together with a small magnetic stirring bar to form a bottom layer *s* which seals off the lower end of the inner tube and thus separates the aqueous phases *o* and *i*. The sample to be extracted is placed in the outer chamber *o* on top of the organic layer, and a suitable aqueous solvent is placed inside the inner tube *i* to approximately the same height as the sample. When the magnetic stirrer is set in motion, the material to be extracted passes via the organic solvent into the inner aqueous phase *i*.

The composition of the two aqueous phases must be adjusted to make the transfer of the material of interest from one aqueous phase to the other as complete as possible. Thus, for the transfer of alkaloids, the sample is treated with alkali to give it a p_H of slightly above 9 (phenolphthalein), whereas the inner aqueous phase is acidified with hydrochloric or sulfuric acid. The free alkaloid released by the alkali in the sample

is extracted into the organic phase and reacts with the acid to accumulate in the form of salt in the inner aqueous phase. At the same time, fats and similar materials, which are present in the sample, collect in the organic phase. Thus, the alkaloids are isolated in a high state of purity by a single operation.

Acidic substances such as the barbiturates are isolated in an analogous manner by acidifying the sample with hydrochloric acid and stripping the solvent with pure water or an alkaline solution in the inner tube. Addition of a little ammonia to the water produced satisfactory results. If the distribution coefficients do not favor high yields, the inner aqueous phase may be drawn off periodically and replaced with fresh solvent.

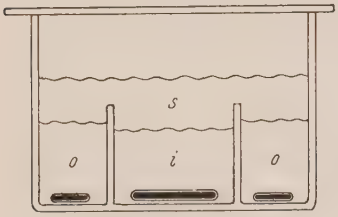


Fig. 2. Extractor for Lighter-Than-Water Solvents. One half Size

The extractor shown in Fig. 2 operates on the same principle with solvents lighter than water. It resembles the *Conway* cell[7], but is taller and has a relatively lower inside well. The sample to be extracted is placed in the outer compartment; the second aqueous phase, in the inner compartment; and the organic solvent is placed on top to fill the well above the inner ring. Two or three very small magnetic stirring bars are dropped into the outer compartment; a single larger one, in the center compartment; and the entire system is placed over a rotating magnet. The top of the vessel is covered with a glass plate to minimize evaporation.

The size of both extractors may be varied within rather wide limits to accommodate different sizes of sample, though samples of widely different size can be used in a single extractor. It is important for rapid operation that the inner compartment is not too small since the area of its interface with the solvent will determine the rate of transfer. A suitable general purpose extractor of the type first described had an outside diameter of 50 cm and an inner tube of 22 cm. The second type of extractor was given a diameter of 7.5 cm and a height of 5 cm.

Testing and Results

The choice of solvent was soon found to be important for the proper functioning of both extractors. Because of the wide use of chloroform as a heavier-than-water solvent, it was tried first. The first tests with morphine and strychnine gave crystalline salts of the alkaloids of satisfactory purity, but the yields appeared low. Evaporation of the chloroform gave a considerable amount of strychnine and some morphine, which had not been transferred to the aqueous phase that consisted of

3 *M* hydrochloric acid. Carbon tetrachloride was substituted for chloroform and found to give better transfer of the alkaloids, apparently because of the more favorable distribution ratio between the solvent and the acid. It was also found that a more dilute acid favored the transfer of the alkaloid since an excess of acid tended to salt out the alkaloidal salt.

Chloroform was found preferable for the extraction of morphine. For other alkaloids, the best transfers were obtained with 30 ml of carbon tetrachloride as solvent and 8 ml of 1.2 *M* hydrochloric acid (1 : 10) as inner aqueous phase. Sulfuric acid was not used because it was desired to isolate the extracted salts for weighing and determination of yield. After stirring for 3 hours, the acid phase was removed, fresh acid added, and the extraction continued for an additional hour. Five materials, which are extractable from basic solution, were tried and the recoveries are shown in Table I.

Table I[1]

Alkaloid	Taken mg	Recovered mg	Yield %
Strychnine base	4.0	3.5	87
	3.9	3.35	88
Codeine phosphate	5.1	4.9	96
	4.1	3.5	85[2]
Ephedrine hydrochloride	4.3	2.0	46[3]
	4.2	3.5	83
Benzedrine sulfate	4.9		86
Morphine	3.1	.5	poor
Morphine[4]	4.2	3.1	64

[1] 30 ml carbon tetrachloride; 8 ml 1 : 10 HCl in inner compartment; time of extraction, 4 hrs. with change of inner phase at end of 3 hrs.

[2] Extract spilled.

[3] Not stirred well.

[4] Extracted with chloroform.

It was of interest to ascertain whether toxicological samples could be directly extracted with satisfactory results, or whether pre-extraction with alcohol, precipitation of proteins, or other extra steps were necessary to facilitate the isolation of the alkaloids. The matter was tested by adding strychnine to canned dog food, which approximates an organ homogenate. The treated dog food was covered with a layer of tartaric acid solution and well mixed with it. The material was then centrifuged and the supernatant aqueous layer, which was quite cloudy, was transferred into the outer chamber of the extractor. A little phenolphthalein was added and then strong sodium carbonate solution until the mixture turned red. Extraction was performed as described above and gave a clear aqueous extract that, on evaporation, furnished crystalline strychnine hydrochloride with an apparently reasonable yield. Because of the

difficulty of adequately recovering the alkaloid in the centrifugate, a determination of absolute yield was not attempted. Another direct application to physiological material was tried by adding morphine to urine and extracting it. A clean crystalline hydrochloride was obtained also in this instance when the inner aqueous phase was evaporated to dryness.

During extraction of the centrifugate from the highly proteinaceous dog food, it was noted that much precipitate was formed, which remained suspended at the interface in the outer compartment. In addition, much fatty material could be found by evaporating the organic solvent, but significant quantities of it did not transfer into the acid phase.

Little was done with the second type of extractor, partially because of the difficulty of finding a suitable lighter-than-water solvent. Ether was avoided because of its excessive volatility. Normal butyl alcohol seemed most promising and was found to extract morphine from urine rather satisfactorily, but it has the disadvantage that acids and alkalies are somewhat soluble in the alcohol; if the extraction is carried out long enough to give reasonable transfer, acid is extracted backward and neutralizes the alkaline outer phase which has to be repeatedly treated with sodium carbonate to maintain the desired p_H. Amyl alcohol was tested in the hope of avoiding this difficulty, but the results were not satisfactory. If a suitable solvent were found, it seems that the second type of extractor would be more rapid in operation and should become highly valuable.

The heavier-than-water solvent extractor was tested also with the barbiturate Dial. Carbon tetrachloride was used as organic phase. The sample solution was slightly acidified with hydrochloric acid, and distilled water or water containing ammonia was placed into the inner tube. The addition of ammonia gave slightly better recovery than did water alone, but in neither instance was the recovery, approximating 25%, considered to be truly satisfactory. Renewal during extraction of the inner aqueous phase raised the recoveries somewhat. It is obvious, however, that the general approach should be as useful with barbiturates as with alkaloids. The customary extraction procedure also often gives low yields of barbiturates. Further investigation of this extraction is intended, and there is reason to expect that the separation will be improved. It should be mentioned that the quality of the isolated Dial was excellent; it formed well-developed crystals and appeared to be pure.

Summary

Two designs of extractors were developed and tested for removal of small amounts of acidic and basic poisons from biological materials. The first of these operated with heavier-than-water solvents placed between two aqueous phases. By adjusting the chemical composition of the two aqueous phases, a double extraction was performed, first to the organic

solvent and, secondly, from it into the second aqueous phase. The second extractor was similar except that it operated with lighter-than-water solvents.

Rapid extraction of basic poisons such as alkaloids was achieved with formation of pure preparations. Extraction of a single barbiturate gave an unsatisfactory yield but produced a pure product. The extractors reduced greatly the amount of labor and time involved in separating small amounts of poisons from materials of toxicological interest.

Zusammenfassung

Zwei Ausführungsformen von Extraktoren für die Isolierung saurer und basischer Gifte aus biologischem Material wurden geprüft. Die erste Ausführungsform ist für Lösungsmittel bestimmt, die schwerer sind als Wasser. Dieses Lösungsmittel trennt zwei wäßrige Phasen, deren p_H so eingestellt wird, daß eine Doppelübertragung der Gifte — erst in das organische Lösungsmittel und dann in die zweite wäßrige Phase — möglich wird. Die zweite Ausführungsform funktioniert nach demselben Prinzip, aber mit Lösungsmitteln, die leichter sind als Wasser.

Die Schnellextraktion alkalischer Gifte (Alkaloide) lieferte die Substanzen in reiner Form. Ein Versuch mit einem Barbiturat gab ebenfalls ein reines Produkt, aber in schlechter Ausbeute. Die beschriebenen Extraktoren ersparen viel Arbeit und Zeit in der Abtrennung kleiner Mengen Giftstoffe für toxikologische Zwecke.

Résumé

Deux modèles d'appareils ont été étudiés pour l'extraction de petites quantités de poisons acides et basiques des milieux biologiques. Le premier d'entre eux comporte des solvants plus denses que l'eau placés entre deux phases aqueuses. En ajustant la composition chimique des deux phases aqueuses, il a été possible d'effectuer une double extraction, tout d'abord celle du solvant organique et ensuite, à partir de ce solvant dans la seconde phase aqueuse. Le second extracteur est semblable, mais il comporte des solvants moins denses que l'eau.

Il a été possible d'effectuer des extractions rapides de poisons basiques, tels que les alcaloïdes avec obtention de préparations pures. L'extraction d'un barbiturate isolé se fait avec un rendement qui n'est pas satisfaisant mais fournit un produit pur. Les extracteurs ont permis de réduire considérablement le travail et le temps consacrés à la séparation de petites quantités de poisons de substances soumises à un examen toxicologique.

Literature

[1] *M. Feldstein* and *N. C. Klendshoj*, Analyst **78**, 43 (1953).

[2] *H. J. Goldbach* and *R. Opfer-Schaum*, Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **40**, 433 (1951).

[3] *G. E. Turfitt*, J. Pharm. Pharmacol. **111**, 321 (1951).

[4] *C. P. Stewart*, *S. K. Chatterji* and *S. Smith*, Brit. Med. J., Oct. 23, 1937, p. 793.

[5] *C. G. Daubney* and *L. C. Nickolis*, Analyst **62**, 851 (1937).

[6] *A. Karler*, *C. L. Brown* and *P. L. Kirk*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1585.

[7] *E. J. Conway*, Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. London: Crosby Lockwood and Son. 1947.

School of Criminology, University of California, Berkeley

Electrochromatophoretic Isolation of Alkaloids*

By

Charlotte L. Brown and **Paul L. Kirk**

(Received February 2, 1957)

Organic, non-volatile poisons are traditionally removed from biological mixtures by a combination of extraction methods with final evaporation of a solvent to obtain the solid substance. Acidic and basic poisons are separated by extraction from basic and acidic media, respectively. Along with the poison is always extracted a certain amount of lipoidal material and a number of biological materials which will vary depending on the amount of putrefaction and other factors. As a rule, extraction alone does not produce a well purified specimen of the material in question.

For some years, alkaloids[1-3], barbiturates[4,5], and many miscellaneous drugs have been separated from each other and to a considerable extent identified on the basis of their chromatographic movement on a filter paper. To a lesser extent, some of the same types of material have been separated and effectively isolated by electrophoresis on a paper support. In both of these procedures, the isolated material ends in a spot on a piece of filter paper, where it is not accessible to crystal tests and only subject to a few color tests. In these techniques the amount of the material being separated is necessarily very small, even when much larger amounts of the material are available.

It was believed that electrochromatophoresis[6] might be useful in isolation of these materials because the separated material is collected in microtest tubes where it is accessible for any suitable type of test. Furthermore the process is continuous and may be carried out for a long or short time as desired to adjust the final yield. Because of the ability to use a slow continuous feed of sample, there is little limitation on the amount of material that may be processed. Large continuous

---

* Dedicated to Prof. *H. Lieb* on the occassion of his 70th birthday. Aided by grants from the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service, and the Research Committee, University of California.

electrophoresis equipment is inherently capable of processing large quantities of toxicological specimens, but this is not necessary for identification purposes since small amounts suffice for identification and require much less time to separate and isolate. Considerable success was met in getting gross separations of alkaloids from biological mixtures and compounds significantly differing in behavior from the alkaloids. The possibility of using the continuous process for separating similar alkaloids from each other and in a satisfactory state of purity has not yet been explored.

Experimental

The apparatus used was that previously described for micro electrochromatophoresis[6]. The curtains were cut from Schleicher & Schüll 598 paper, which has approximately optimal properties for this purpose. It has the correct thickness to produce a flow rate that conveniently balances a current which is just sufficient to produce good separations. The buffer that was found satisfactory was 0.05 *M* ammonium acetate solution. This had the advantage that it could be completely removed from the separated alkaloid by means of an infrared heat lamp. The sample was fed from a micro test tube (this was supported above the sample position) and had a paper wick connecting the liquid in the tube with the point of application, which was usually close to the center of the grid. As a rule, the voltage was 75 V and produced a current of about 1.5 mA. Use of higher voltage gave better separation, but tended to evaporate much water from the buffer with the effect of distorting the electrical pattern. Cooling, desirable for the prevention of solvent loss, was not used.

The alkaloids tried were found in the 4th and 5th tubes from the right side under the conditions specified. The liquid delivered into these tubes was evaporated under the heat lamp to form crystals of alkaloid and to remove all the buffer together with the water. The residues were tested by the conventional crystal tests which gave as good results as with pure alkaloids.

The paper was stained to determine the path of the alkaloids. It was dried under the heat lamp and then stained after a waiting period of 24 hours. To this end, it was brushed with a solution of bromphenol blue or of bromcresol green in alcohol. Frequently the colors became clearly defined only after the dry paper had remained standing over night or longer. The longer the papers were stored, the stronger became the stains. Bromphenol blue gave the best stains ultimately, but required longer to develop than did bromcresol green. Better staining may be obtained with iodoplatinate reagent, which was not used in this investigation.

Another method for detecting the band of alkaloid was tested and gave moderately satisfactory results. This consisted of continuously adding picric acid solution simultaneously with the alkaloid sample but on the other end of the paper. In all instances, the polarity of the electrical

system was such that the alkaloid migrated to the right, whereas the picric acid migrated to the left. Where the two bands crossed, the alkaloidal picrate precipitated and remained in place on the paper while the excess of picric acid continued to migrate in the same direction as before the intersection. By terminating the addition of picric acid and sample before stopping the current or flow of buffer, the excess picric acid could be removed so that only a yellow spot of alkaloidal picrate remained on the paper. This method, naturally, did not deliver the alkaloid to the receiver tube like the previously described procedure.

The method was first tried with pure solution of strychnine hydrochloride and morphine hydrochloride. When the dilution was very high, the process became difficult and time consuming. Thus an extraction method was developed which permitted considerable reduction of the volume of the solution that contained most of the alkaloid present. For testing the method under the conditions of actual practice, samples of strychnine salts were added to canned dog food to simulate the biological homogenates customarily used in general toxicology. The homogenates were subjected to the double extraction method described[7], and the alkaloid was isolated as a pure sample by the electrochromatophoretic technique given above. Because of the high dilution of the alkaloid and the high content of solid and emulsified material, electrochromatophoretic treatment of the original homogenate was never tried.

A further test of the usefulness of electrochromatophoresis as a primary method for separating alkaloids directly from biologically complex mixtures was made by adding either strychnine or quinine or morphine to whole blood. The blood was fed directly to the curtain by means of a relatively broad paper strip (4 mm) at the left end of the grid while picric acid was fed on the right end. The mobility of the three alkaloids tested was sufficiently above that of any of the protein constituents of the blood to produce very clear-cut separations, which were demonstrated by the picric acid precipitate. The current was applied at 200 V for about 3 hours. The concentration of alkaloid was much greater than would ever be true of the blood of a person or animal, so that the experiments do not prove direct applicability of the method as a means of detecting in blood the nature of a poison. They indicate the possibility of doing so, however, and prove that electrochromatophoresis alone is sometimes effective as the sole means for the separation of poisons from biological mixtures without preliminary extraction or any other type of separation.

Summary

Separation of very small amounts of three alkaloids, strychine, morphine and quinine, from impure samples and biological mixtures was tested by continuous preparative electrophoresis, termed micro

electrochromatophoresis. Separations could be achieved from extracts of biological mixtures and from blood without extraction when the amounts of alkaloid were sufficient. The substances were collected in pure form in micro test tubes, where they could be identified by the common alkaloidal reactions.

A technique of detecting alkaloid by feeding picric acid to the paper during the separation is described. Where the picric acid stream intersects the alkaloid stream, the alkaloidal picrate is deposited as an insoluble yellow residue.

Zusammenfassung

Die Abtrennung sehr kleiner Mengen der Alkaloide Strychnin, Morphin und Chinin aus unreinen Präparaten und biologischem Material wurde mittels kontinuierlicher Elektrophorese versucht, die für präparative Zwecke benutzt und als Mikroelektrochromatophorese bezeichnet wird. Trennungen gelingen mit Extrakten aus biologischem Material und mit Blut ohne vorherige Extraktion. Die Substanzen konnten in reiner Form in Mikroproberöhrchen gesammelt werden, in denen sie mittels der üblichen Alkaloidreaktionen nachgewiesen wurden.

Außerdem wird ein Verfahren zur Auffindung der Alkaloide durch gleichzeitige Elektrochromatophorese von Pikrinsäure beschrieben. Der Pikratniederschlag gibt dort, wo sich der Strom der wandernden Pikrinsäure mit jenem des Alkaloids überschneidet, einen unlöslichen gelben Fleck auf dem Papier.

Résumé

Essai de séparation de très petites quantités des trois alcaloïdes strychnine, morphine et quinine à partir d'échantillons impurs et de mélanges biologiques par électrophorèse préparative continue dénommée microélectrochromatophorèse. Il a été possible d'effectuer les séparations sans extraction, à partir d'extraits de mélanges biologiques et du sang lorsque la teneur en alcaloïdes était suffisante. Les substances étaient recueillies sous forme pure dans des microtubes à essais dans lesquels il était possible de les identifier par les réactions habituelles des alcaloïdes. Description d'une technique permettant de déceler les alcaloïdes en alimentant le papier en acide picrique. Au point d'intersection du courant d'acide picrique et du courant d'alcaloïde, le picrate d'alcaloïde se dépose sous forme d'un résidu jaune insoluble.

Literature

[1] *P. L. Kirk*, Ann. Rev. Med. **6**, 295 (1955).

[2] *O. E. Schultz* and *D. Strauss*, Arzneimittel-Forsch. **5**, 342 (1955); *A. S. Curry* and *H. Powell*, Nature **173**, 1143 (1954).

[3] *F. Lupant-Andre*, Ann. soc. roy. sci. med. et mat. Bruxelles **7**, 129 (1954).

[4] *O. A. Guagnini, E. E. Vonesch, A. M. Fassi* and *S. V. Guagnini*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 1061.

[5] *R. Deininger*, Arzneimittel-Forsch. **5**, 472 (1955).

[6] *A. Karler, C. L. Brown* and *P. L. Kirk*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1585.

[7] *P. L. Kirk* and *C. L. Brown*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 714.

University of Buenos Aires, School of Medicine, Department of Analytical Chemistry, Buenos Aires, Argentina

Pyrylium Colors from Nicotine*

By

P. Luis and **J. B. Niederl**

(Received April 17, 1957)

At the recent Congress of Microchemistry held in Vienna, Austria. a sensitive microchemical color reaction for nicotine was presented[1]. In the ensuing discussion, there were questions concerning the structure of the colored compound formed. Up to that time, a di-ketone, in form of its bis-2,4-dinitro phenylhydrazone[2] had been isolated. Subsequent structure proof work, using standard micro-analytical and preparative techniques as devised by *F. Emich*[3], *H. Lieb* and *W. Schöniger*[4] showed, however, that this di-ketone is not the final product, but rather an intermediate.

In the qualitative studies, it became apparent that the colored compound exhibits a chemical behaviour established as typical by *A. Bernthsen*[5] for pyrylium and flavylium salts. Quantitative elementary analysis of the free base further narrowed down the possibilities and pointed to a rather simple structure, such as pyrido-pyrene, which apparently had formed by the following reaction:

$$\underset{\text{Nicotine}}{C_{10}H_{14}N_2} \xrightarrow[-CH_3NH_2 - CO_2 - H_2O]{+2O_2} \underset{\text{Pyrido-pyrene}}{C_8H_7NO}$$

Analysis[6]: Calc. for C_8H_7NO: C, 72.2%; H, 5.2%; N, 10.5%.
Found: C, 72.5% and 72.32%; H, 5.0% and 4.9%; N, 10.52% and 10.64%.

The colored substance given by this base upon treatment with strong mineral acids shows exactly the same chemical properties and charac-

* Dedicated to Professor *Hans Lieb* on occasion of his 70th birthday.

Further details of this proof of structure will be published in an appropriate journal on organic chemistry.

teristics as its nitrogen free analogs, the benzo-pyrylium salts, first prepared and studied by *A. Houben*[7].

Summary

The colored substance given by nicotine under special oxidizing conditions and subsequent treatment of the resulting product with concentrated sulfuric acid proved to be pyrido-pyrylium sulfate.

Zusammenfassung

Der Farbstoff, der sich unter speziellen Oxydationsbedingungen und nachfolgender Behandlung des resultierenden Produktes mit konz. Schwefelsäure aus Nikotin bildet, erwies sich als Pyridopyrylium-Sulfat.

Resumen

El colorante formado de nicotina, usando condiciones especiales de oxidación y tratamento con acido sulfurico concentrado del producto resultando, se revela ser el sulfato de un compuesto de tipo pyrido-pyrylium.

Résumé

La substance colorée obtenue par oxydation de la nicotine dans des conditions particulières et traitement ultérieur du produit résultant par l'acide sulfurique concentré s'est avérée être le sulfate de pyrido-pyrylium.

Literature

[1] *P. Luis* and *J. B. Niederl*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 948.

[2] *P. Luis*, Rev. Asoc. Bioquim, Argentina **259**, 18 (1953); Anal. Farm. y Bioquim., Argentina **177**, 12 (1941); Analyst **81**, 548 (1956).

[3] *F. Emich*, Lehrbuch der Mikrochemie. Munich: Bergmann. 1926.

[4] *H. Lieb* and *W. Schöniger*, Präparative Mikromethoden in der organischen Chemie. Vienna: Springer-Verlag. 1954.

[5] *A. Bernthsen*, A Textbook of Organic Chemistry. London and Glasgow: Blakie & Son. 1942. pp. 1145.

[6] *C. Tiedcke*, private cemmunication Dec. 23, 1955.

[7] *A. Houben*, Ber. dtsch. chem. Ges. **37**, 495 (1904).

Laboratorio da Produção Mineral, Ministerio da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasilien

Beiträge zur organischen Tüpfelanalyse*

Von

F. Feigl, J. R. Amaral und **V. Gentil**

(Eingegangen am 12. Juni 1957)

In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde darauf hingewiesen, daß Erfahrungen und Betrachtungsweisen der Chemie der spezifischen, selektiven und empfindlichen Reaktionen bei der Suche nach neuen, in der organischen Tüpfelanalyse verwendbaren Nachweisen von großem Nutzen sind. Hierfür werden im nachfolgenden weitere Beispiele vorgelegt.

I. Nachweis von Harnstoff

Die zur gasvolumetrischen Bestimmung von Harnstoff viel verwendete Redoxreaktion mit Hypochlorit entspricht folgender Formulierung:

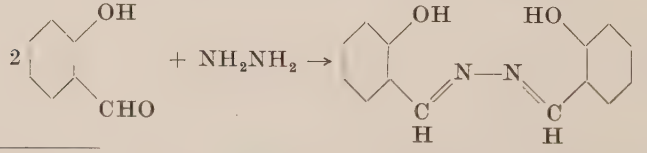
$$CO(NH_2)_2 + 3\ NaClO \rightarrow 3\ NaCl + CO_2 + 2\ H_2O + N_2. \qquad (1)$$

Indessen ist (1) nur als Bruttogleichung gültig, zu der man durch Addition der Teilreaktionen (2) und (3) gelangt:

$$CO(NH_2)_2 + NaClO \rightarrow NaCl + CO_2 + NH_2NH_2, \qquad (2)$$

$$NH_2NH_2 + 2\ NaClO \rightarrow 2\ NaCl + 2\ H_2O + N_2. \qquad (3)$$

Schestakow[1] hat den eindeutigen experimentellen Beweis für die intermediäre Bildung von Hydrazin durch die Feststellung erbracht, daß bei Einwirkung von Hypochlorit auf Harnstoff in Gegenwart von Salicylaldehyd eine Abscheidung von Salicylaldazin gemäß



(4)

* Herrn Prof. Dr. *F. Wessely* zum 60. Geburtstag gewidmet.

erfolgt. Die Gleichung (2) für die primäre Bildung von Hydrazin ist die Bruttogleichung* für den Hofmannschen Abbau des Harnstoffes, der als Diamid der Kohlensäure diesem für Amide von Carbonsäuren charakteristischen Abbau[2] unterliegt.

Die zu farblosem Salicylaldazin führende Kondensation dient einem spezifischen Nachweis von Hydrazin in der Tüpfelanalyse[3]. Neuerdings wurde gefunden[4], daß Salicylaldazin im UV-Licht intensiv gelb-grün fluoresziert, was die sichere Erkennung minimaler Mengen dieser säureresistenten Verbindung erleichtert. Es war deshalb naheliegend, die von *Schestakow* erkannte Bildung von Hydrazin beim Hofmannschen Abbau des Harnstoffes mit der empfindlichen Fluoreszenzreaktion (4) zu kombinieren, um dadurch zu einem neuen Nachweis von Harnstoff zu gelangen. Hierfür haben sich die nachstehenden Reaktionsbedingungen bewährt.

Arbeitsweise: In einer Mikroeprouvette wird ein Tropfen der Probelösung mit je einem Tropfen Natriumhypochloritlösung, alkoholischer Salicylaldehydlösung und 20%iger Natronlauge versetzt und im siedenden Wasserbad 3 Minuten erwärmt. Nach Erkalten wird mit Eisessig angesäuert. Ein Niederschlag oder eine Trübung, die im UV-Licht intensiv gelb-grün fluoresziert, verweist auf die Anwesenheit von Harnstoff. Es ist empfehlenswert, von dem essigsauren Gemisch einen Tropfen auf Filtrierpapier zu bringen und den Tüpfelfleck im UV-Licht zu betrachten. Auf diese Weise sind Spuren von fluoreszierendem Salicylaldazin gut erkennbar.

Erfassungsgrenze: 0,5 μg Harnstoff.

Reagenzien: 1. 0,5-n Lösung von Natriumhypochlorit**. 2. Lösung von 5 Tropfen Salicylaldehyd in 100 ml Äthylalkohol.

Von Harnstoffderivaten zeigten Methylharnstoff und Acetylmethylharnstoff nach Behandlung mit Hypochlorit usw. gleichfalls eine Aldazinfluoreszenz. Keine Aldazinreaktion wurde festgestellt bei as-Diphenylharnstoff, m-Tolylharnstoff, Semicarbazid-Chlorhydrat, s-Di-m-Tolylharnstoff, Phenylharnstoff und Allylharnstoff.

II. Nachweis und Unterscheidung von o- und p-Dinitrobenzol

Die drei isomeren Dinitrobenzole, die wichtige Ausgangsverbindungen für Farbstoffsynthesen sind, lassen sich bei Vorliegen reiner Präparate durch die Bestimmung der Schmelzpunkte sehr leicht und nach *Kofler*[5] auch in Mikromengen identifizieren. In Gemischen und bei Gegenwart anderer Verbindungen führt diese physikalische Methode jedoch nicht zum Ziele. Da die Trennung der Isomeren sehr schwierig und bei kleinen Mengen geradezu aussichtslos ist, besteht ein Bedarf für die chemische Identifizierung oder zumindest für eine charakteristische Unterscheidung.

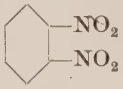
---

* Über die zu (2) führenden Teilreaktionen vgl. [1].

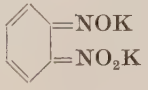
** Bereitung vgl. Organic Reactions, Bd. 3. New York. 1949. S. 281.

Es wurde versucht, hierfür die seit langem bekannte, zu farbigen Produkten führende Reduktion der o- und p-Isomeren zu verwerten.

Meisenheimer[6] hat zuerst festgestellt, daß bei Einwirkung bestimmter anorganischer und organischer Reduktionsmittel auf alkoholisch-alkalische Lösungen von o- und p-Dinitrobenzol blauviolette bzw. orangerote wasserlösliche Verbindungen entstehen. Nach *Kuhn* und *Weygand*[7] handelt es sich beim o-Dinitrobenzol (I) um die Bildung eines o-chinoiden Alkalisalzes (II).



I



II

Wahrscheinlich wird p-Dinitrobenzol zu einer analogen p-chinoiden Verbindung reduziert, während bei m-Dinitrobenzol eine allfällige Reduktion zu einer farblosen Verbindung führt.

Von *Feigl* und *Vokač*[8] wurde festgestellt, daß die Farbreaktionen mit o- und p-Dinitrobenzol von organischen Verbindungen bewirkt werden, die in alkalischer Lösung als Wasserstoffdonatoren fungieren, und daß sich darauf ein allgemeiner Nachweis derartiger Verbindungen begründen läßt. (Hierfür ist als Reagens o-Dinitrobenzol am besten geeignet.)

Es wurde gefunden, daß sich die drei isomeren Dinitrobenzole in sehr charakteristischer Weise unterscheiden, wenn die Einwirkung der Reduktionsmittel (Ascorbinsäure, Zucker, Polyphenole) bei bestimmter Alkalität und bei Zimmertemperatur erfolgt. Aus der nachstehenden Tabelle sind die dabei auftretenden Färbungen zu entnehmen.

Dinitrobenzol	0,05-n NaOH	2%ige NaOH	$MgCO_3$
o-Verbindung ...	blauviolett	blauviolett	—
m-Verbindung ..	—	—	—
p-Verbindung ...	rotorange	gelb	rotorange

Wie diese Tabelle zeigt, erlauben die Farbreaktionen eine sichere Unterscheidung von o- und p-Dinitrobenzol; sie erfolgen auch mit kleinen Substanzmengen und in verd. Lösungen, wenn als Reduktionsmittel Phenylhydrazin verwendet wird.

Arbeitsweise (o-Dinitrobenzol): Auf einer Tüpfelplatte wird zu einem Tropfen der alkoholischen Probelösung je ein Tropfen 2%iges wäßriges Phenylhydrazinchlorid und ein Tropfen 2%ige Natronlauge zugesetzt und verrührt. Je nach der Menge an o-Dinitrobenzol entsteht eine mehr oder weniger intensive Blauviolettfärbung.

Erfassungsgrenze: 0,2 μg o-Dinitrobenzol.

Nach obiger Vorschrift waren bei Anstellung einer Vergleichsprobe 0,2 μg o-Dinitrobenzol in einem Tropfen einer gesättigten alkoholischen Lösung von p-Dinitrobenzol nachweisbar.

Arbeitsweise (p-Dinitrobenzol): In die Vertiefung einer Tüpfelplatte werden 0,01 bis 0,02 g Magnesiumcarbonat gebracht und nacheinander (ohne zu verrühren) je ein Tropfen der alkoholischen Probelösung und ein Tropfen 2%iges wäßriges Phenylhydrazinchlorid zugesetzt. Die Mischung wird für 2 bis 5 Minuten in einem auf 110 bis 120° geheizten Trockenschrank belassen. Je nach der Menge p-Dinitrobenzol hinterbleibt ein mehr oder weniger orangefarbiger Rückstand.

Erfassungsgrenze: 1 μg p-Dinitrobenzol.

Diese Erfassungsgrenze gilt auch für den Nachweis von p-Dinitrobenzol in einer gesättigten alkoholischen Lösung von o-Dinitrobenzol.

III. Nachweis von Estern der salpetrigen Säure

Organische Verbindungen mit —O—NO- oder —O—NO_2-Gruppen verhalten sich zu Lösungen von Diphenylamin oder NN′-Diphenylbenzidin in konz. Schwefelsäure wie salpetrige Säure und Salpetersäure, das heißt, die beiden Basen werden zu blauen, chinoiden Verbindungen oxydiert. Diese aus der anorganischen Analyse lange bekannten, empfindlichen Farbreaktionen werden in der organischen Tüpfelanalyse zum Nachweis von Estern der salpetrigen und Salpetersäure, sowie von Nitraten organischer Basen verwendet[9]; die Möglichkeit einer Unterscheidung organischer Derivate der Salpeter- und salpetrigen Säure ist bisher nicht beachtet worden. Infolge ihrer leichten Verseifbarkeit zeigen Alkylnitrite die Reaktionen der salpetrigen Säure. Demgemäß entsteht bei Vereinigung mit dem Grießschen Reagens die bekannte Rotfärbung, was einen einfachen und selektiven Nachweis der —O—NO-Gruppe in organischen Verbindungen gestattet, da Ester der Salpetersäure und Nitrate organischer Basen diese Farbreaktion nicht zeigen. Der Nachweis kann in Lösung (Arbeitsweise I) oder mit niedrig siedenden Alkylnitriten auch in der Gasphase (Arbeitsweise II) durchgeführt werden.

Arbeitsweise I: In eine Mikroeprouvette wird ein Tropfen der Probelösung gebracht, ein Tropfen Grieß-Reagens zugesetzt und durch Eintauchen in siedendes Wasser erwärmt. Je nach der Menge Alkylnitrit entsteht eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung.

Erfassungsgrenze: 0,2 μg Amylnitrit.

Arbeitsweise II: In eine Mikroeprouvette wird ein Tropfen der Probelösung gebracht, auf das offene Ende ein Scheibchen mit Grieß-Reagens befeuchtetes Filterpapier gelegt und die Eprouvette in siedendes Wasser getaucht. Je nach der Menge flüchtigen Alkylnitrits entsteht auf dem Papier innerhalb 1 bis 3 Minuten ein roter oder rosa Fleck.

Erfassungsgrenze: 10 μg Amylnitrit.

Reagens: Frisch bereitete Mischung gleicher Teile einer 1%igen Lösung von Sulfanilsäure in 30%iger Essigsäure und einer 0,1%igen Lösung von α-Naphthylamin in 30%iger Essigsäure.

IV. Unterscheidung von Salicylsäure und Sulfosalicylsäure

Sofern reine Präparate vorliegen, können Salicylsäure und Sulfosalicylsäure durch die Bestimmung der Schmelzpunkte (158 bzw. 224°) leicht voneinander unterschieden werden. Mit Gemischen oder bei Gegenwart anderer organischer Verbindungen führt diese Methode nicht zum Ziele, sondern erfordert die vorherige Trennung und Isolierung der Säuren, was bei ungünstigen Mischungsverhältnissen nicht einfach ist, insbesondere dann, wenn nur kleine Materialmengen geprüft werden sollen. Zur chemischen Unterscheidung der beiden Phenolsäuren sind in der Tüpfelanalyse zwei Verfahren beschrieben worden[10], die indessen nicht voll befriedigen.

Ausgangspunkt für die Auffindung eines neuen Nachweises von Sulfosalicylsäure war die überraschende Feststellung[11], daß bei trockenem Erhitzen eines Gemisches von Alkalinitrat mit nicht flüchtigen organischen Verbindungen (bis zu deren beginnender Verkohlung) salpetrige Säure entsteht, die in der Gasphase durch die Farbreaktion nach *Grieß* empfindlich nachweisbar ist. Folgende Erklärung für diesen — auch bei kleinen Mengen organischer Substanz eintretenden — Effekt scheint plausibel: Beim trockenen Erhitzen von Alkalinitraten mit organischen Verbindungen erfolgt topochemische Reduktion zu Alkalinitrit; zugleich entsteht bei der Pyrolyse organischer H- und O-haltiger Verbindungen Wasser, das an seinem Bildungsort als überhitzter Wasserdampf wirksam sein kann. Dadurch kommt es zu einer weitgehenden Hydrolyse von Alkalinitrit unter Verflüchtigung salpetriger Säure*. Es erschien durchaus möglich, daß die pyrolytische Bildung salpetriger Säure innerhalb gewisser Temperaturbereiche für bestimmte organische Verbindungen oder darin enthaltene Atomgruppen charakteristisch sein könnte. Bei diesbezüglichen Versuchen mit Milligrammengen verschiedenartiger organischer Verbindungen wurde gefunden, daß Sulfosalicylsäure eine Ausnahmestellung einnimmt, da sie bereits bei 100° und nahezu momentan mit Alkalinitrat salpetrige Säure bildet. Es handelt sich hierbei nicht um einen pyrolytischen Vorgang, sondern darum, daß Sulfosalicylsäure aus Alkalinitrat zunächst Salpetersäure freimacht, die ihrerseits Sulfosalicylsäure, bzw. deren Alkalisalz, unter Bildung salpetriger Säure oxydativ zersetzt. Da Salicylsäure in Grammengen und bei langem Erwärmen mit Alkalinitrat auf 100° keine salpetrige Säure bildet, erschien es aussichtsreich, einen Nachweis von Sulfosalicylsäure auf deren Verhalten gegenüber Alkalinitrat zu begründen.

* Die hier gegebene Erklärung steht im Einklang damit, daß Redoxreaktionen organischer Verbindungen mit festen anorganischen Oxydanzien sowie hydrolytische Aufspaltungen bekannt sind, die sonst nur bei Temperaturen weit über 100° eintreten. Darauf beruhen empfindliche Nachweise der organischen Tüpfelanalyse[12].

Beim Erwärmen (siedendes Wasserbad) von Sulfosalicylsäure mit Kaliumnitrat in einer Mikroeprouvette, die mit einem Scheibchen mit Grieß-Reagens befeuchteten Filterpapiers bedeckt war, konnten durch die Bildung eines roten Fleckes nur 200 μg Sulfosalicylsäure nachgewiesen werden. Die Ursache für diese geringe Empfindlichkeit ist darin zu suchen, daß die primäre Bildung von Salpetersäure und die anschließende Reduktion zu salpetriger Säure als topochemische Reaktionen nur an Kontaktstellen der festen Reaktionspartner, demnach unvollständig, erfolgen, und daß bei 100° Salpetersäure verdampft. Es wurde deshalb auf die Anwendung des Grieß-Reagens verzichtet und an dessen Stelle als Reagens die von *Riehm*[13] empfohlene farblose Lösung von NN′-Diphenylbenzidin in konz. Schwefelsäure verwendet, die bei Kontakt mit Dämpfen der Salpetersäure und der salpetrigen Säure eine blaue Farbe annimmt. Durch diese Abänderung wurde eine befriedigende Empfindlichkeit für den Nachweis von Sulfosalicylsäure erreicht.

Arbeitsweise: In die Hülse des in der Tüpfelanalyse viel verwendeten Gasabsorptionsapparates werden einige cg trockenes, feingepulvertes Kaliumnitrat gebracht, ein Tropfen der alkoholischen oder ätherischen Probelösung zugesetzt und nahezu zur Trockene verdampft. Der Knopf des Verschlußstückes wird mit einer frisch bereiteten Lösung von 10 mg NN′-Diphenylbenzidin in 50 ml konz. Schwefelsäure befeuchtet und der geschlossene Apparat für 2 bis 3 Minuten in siedendes Wasser getaucht. Bei Anwesenheit von Sulfosalicylsäure nimmt der am Knopf hängende Tropfen eine blaue Farbe an. Durch Abstreifen des Tropfens auf eine Tüpfelplatte sind bei Vergleich mit einer Blindprobe auch geringfügige Blaufärbungen gut erkennbar.

Erfassungsgrenze: 3,5 μg Sulfosalicylsäure.

Das Verfahren ermöglicht den Nachweis von Sulfosalicylsäure und deren sichere Unterscheidung von Salicylsäure. Es ist nicht anwendbar zum Nachweis von Sulfosalicylsäure in Gegenwart starker und mittelstarker Carbonsäuren, da diese aus Alkalinitrat gleichfalls Salpetersäure freilegen (vgl. VI). In solchen Fällen kann die eingangs erwähnte Bildung salpetriger Säure bei Erwärmen mit Alkalinitrat verwertet werden. Der darauf beruhende, allerdings weit weniger empfindliche Nachweis von Sulfosalicylsäure hat aber den Vorteil, durch organische Säuren nicht beeinträchtigt zu werden.

V. Nachweis von Nitraten organischer Basen

Der Nachweis von Nitraten organischer Basen hat an sich wenig praktische Bedeutung, dürfte jedoch bei Reinheitsprüfungen von Salzen organischer Basen von Interesse sein. Das bisher hierfür verwendete Verfahren besteht in der Anwendung der bekannten Farbreaktion von Nitraten mit der Lösung von Diphenylamin oder NN′-Diphenylbenzidin

in konz. Schwefelsäure. Hierbei ist zu beachten, daß analog wie Nitrate auch Salze anderer oxydierender Säuren (Chlorate, Bromate, Jodate, Chromate und Ferricyanide) unter Blaufärbung reagieren.

Im Einklang mit den unter IV gemachten Angaben unterliegen Nitrate organischer Basen bei ihrer Pyrolyse einer innermolekularen Redoxreaktion unter Bildung flüchtiger salpetriger Säure, die in der Gasphase durch das Grieß-Reagens empfindlich nachweisbar ist. Auch bei dieser Pyrolyse ist mit einer teilweisen Verflüchtigung von Salpetersäure zu rechnen. Es ist deshalb, wenn höchste Empfindlichkeit erreicht werden soll, empfehlenswert, pyrolytisch abgespaltene Salpetersäure und salpetrige Säure gemeinsam durch die Blaufärbung einer Lösung von NN′-Diphenylbenzidin nachzuweisen.

Arbeitsweise: Wie unter IV beschrieben, mit der Abänderung, daß in der Hülse des Gasabsorptionsapparates eine winzige Menge der zu prüfenden festen Substanz bzw. Trockenrückstand eines Tropfens ihrer Lösung durch Erhitzen über einem Mikroflämmchen zum Verkohlen gebracht wird.

Erfassungsgrenze: 2,5 μg Kaffeidin-Nitrat.

Das Verfahren wurde überprüft an Nitraten von Pylocarpin, m-Bromchinolin und Guanidin.

VI. Nachweis starker und mittelstarker Carbonsäuren

Die bisher in der Tüpfelanalyse zur Prüfung auf saure Verbindungen beschriebenen Verfahren[14] beruhen auf Umsetzungen, die keine Unterscheidung starker, mittelstarker und schwacher Säuren erlauben, die jedoch mitunter von Interesse ist. Es wurde gefunden, daß das unter IV beschriebene Verfahren (Unterscheidung von Salicylsäure und Sulfosalicylsäure) dazu verwendet werden kann, um das Vorliegen organischer Säuren festzustellen, die aus Alkalinitrat bei 100° Salpetersäure freilegen. Hierzu sind, wie nachstehende Aufstellung zeigt, starke und mittelstarke Säuren befähigt.

Die Arbeitsweise ist gleich der unter IV angegebenen. Bei 2 Minuten langem Erwärmen von zirka 20 mg Säure mit überschüssigem Kaliumnitrat auf 100° führen folgende Säuren zur Freisetzung von Salpetersäure:

Mono-, Di- und Trichloressigsäure,
Monobromessigsäure,
Oxalsäure,
Malonsäure.
Maleinsäure,
Weinsäure,
Zitronensäure,
Äpfelsäure,
Mandelsäure,
Sulfosalicylsäure.

Bei der gleichen Arbeitsweise zeigten folgende Säuren keine Freisetzung von Salpetersäure:

Bernsteinsäure,
Thioglykolsäure,
Zimtsäure,
Benzoesäure,
p-Nitrobenzoesäure,
Salicylsäure,
3,5-Dinitrobenzoesäure,
Phthalsäure,
Gallussäure,
Ölsäure.

Saure Verbindungen ohne Carbonsäurecharakter, die beim Erwärmen mit Kaliumnitrat auf 100° keine Verdampfung von Salpetersäure bewirken, sind: 1,4-Naphtholsulfosäure, 2,6,8-Naphtholdisulfosäure, Pentachlorphenol, Pikrinsäure und Phenylarsinsäure.

Zusammenfassung

Es werden folgende neue Nachweise beschrieben:

1. Nachweis von Harnstoff, beruhend auf dessen Hofmannschem Abbau mit Alkalihypochlorit zu Hydrazin, das mit Salicylaldehyd zu gelbgrün fluoreszierendem Salicylaldazin kondensiert.

2. Nachweis und Unterscheidung von o- und p-Dinitrobenzol, beruhend auf der p_H-abhängigen Reduktion mit Phenylhydrazin zu farbigen chinoiden Produkten.

3. Nachweis von Estern der salpetrigen Säure, beruhend auf deren unmittelbar eintretender Farbreaktion mit dem Grießschen Reagens.

4. Nachweis von Sulfosalicylsäure und deren Unterscheidung von Salicylsäure, beruhend auf der Bildung von Salpeter- und salpetriger Säure beim Erwärmen von Alkalinitrat mit Sulfosalicylsäure auf 100°.

5. Nachweis von Nitraten organischer Basen, beruhend auf deren zu Salpetersäure und salpetriger Säure führender Pyrolyse.

6. Nachweis starker und mittelstarker organischer Säuren, beruhend auf der Freilegung von Salpetersäure beim Erwärmen mit Kaliumnitrat auf 100°.

Sämtliche Nachweise sind in der Arbeitsweise der Tüpfelanalyse ausführbar und besitzen mikroanalytische Erfassungsgrenzen.

Summary

The following new tests are described:

1. Detection of urea based on its Hofmann degradation with alkali hypochlorite to hydrazine. The latter condenses with salicylaldehyde to yield yellow-green fluorescing salicylaldazine.

2. Detection and differentiation of *o*- and *p*-dinitrobenzene based on the p_H-dependent reduction with phenylhydrazine to yield colored quinoidal products.

3. Detection of esters of nitrous acid based on their direct reaction with the Griess reagent.

4. Detection of sulfosalicylic acid and its differentiation from salicylic acid based on the formation of nitric and nitrous esters by warming sulfosalicylic acid with alkali nitrate to 100°.

5. Detection of nitrates of organic bases through their pyrolysis to yield nitrous and nitric acid.

6. Detection of strong and intermediate strong organic acids based on the release of nitric acid when warmed with potassium nitrate to 100°.

All of these tests can be accomplished within the methodology of spot test analysis and have microanalytical limits of identification.

Résumé

Description des méthodes d'identification suivantes:

1° Identification de l'urée reposant sur la formation d'hydrazine par dégradation d'Hofmann résultant du traitement par un hypochlorite alcalin. L'hydrazine condensée sur l'aldéhyde salicylique donne naissance à la salicylaldazine qui présente une fluorescence vert-jaune.

2° Identification et différenciation des o- et p-dinitrobenzènes reposant sur la réduction par la phénylhydrazine en produits quinoniques colorés, en fonction des valeurs du p_H.

3° Identification d'esters de l'acide nitreux reposant sur leur réaction colorée directe sur le réactif de Griess.

4° Identification de l'acide sulfosalicylique et différenciation de l'acide salicylique reposant sur la formation des acides nitrique et nitreux par chauffage d'un nitrate alcalin avec l'acide sulfosalicylique à 100°.

5° Identification de nitrates de bases organiques reposant sur leur pyrolyse avec formation d'acides nitrique et nitreux.

6° Identification d'acides organiques forts et moyens reposant sur la mise en liberté d'acide nitrique par chauffage avec le nitrate de potassium à 100°.

Toutes ces identifications peuvent être effectuées par la technique d'analyse à la touche; leurs limites de sensibilité sont microanalytiques.

Literatur

[1] *P. Schestakow*, J. russ. phys. chem. Ges. **37**, 1; zitiert nach Chem. Zbl. **1905**, I, 1227.

[2] *E. S. Wallis* und *J. F. Lane* in Organic Reactions, Bd. 3. New York. 1949. S. 267.

[3] *F. Feigl*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **58**, 471 (1939).

[4] *F. Feigl* und *W. A. Mannheimer*, Mikrochem. **40**, 50 (1953).

[5] *L. Kofler* und *A. Kofler*, Thermo-Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1954.

[6] *J. Meisenheimer*, Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 4174 (1903); *J. Meisenheimer* und *E. Patzig*, Ber. dtsch. chem. Ges. **39**, 2526 (1906).

[7] *R. Kuhn* und *F. Weygand*, Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 1969 (1936).

[8] *F. Feigl* und *L. Vokač*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 101.

[9] Vgl. *F. Feigl*, Spot Tests in Organic Analysis, 5th Ed. New York: Elsevier. 1956. S. 168.

[10] *F. Feigl*, l. c. [9], S. 368.

[11] *F. Feigl* und *C. Stark-Mayer*, J. Chem. Education, im Druck.

[12] *F. Feigl*, l. c. [9], S. 16, 75, 90, 157, 174, 179, 180, 226, 269, 285, 329, 344, 377, 464.

[13] *H. Riehm*, Z. analyt. Chem. **81**, 439 (1930).

[14] *F. Feigl*, l. c. [9], S. 116ff.

Catedra de Química Analítica Cualitativa, Facultad de Ciencias Medicas, Buenos Aires

La Reacción Hidroestricnica en Escala Micro*

Por

P. Luis y A. Corazza

Con 1 Figura

(Recibido 11 de abril de 1957)

La reacción denominada hidroestrícnica, descubierta por *Malaquin*[1] que fué estudiada y mejorada por *Denigès*[2], es considerada como el ensayo mejor y más sensible para reconocer dicho alcaloide.

En el curso de los ensayos para practicar dicha reacción en escala micro[3] y confirmando observaciones anteriores, se comprobó que la sensibilidad de la reacción estaba condicionada al tiempo que se prolongara la reducción. En este trabajo se establece un tiempo mínimo de calentamiento con cinc y ácido clorhídrico, detalle este al que no le prestan la atención debida las obras especializadas de toxicología y química legal[4–14].

Por otra parte presentamos una técnica que permite reconocer la estricnina en escala micro y su aplicación a productos farmaceuticos. Destacamos asímismo los excelentes resultados en pericias químico-legales.

Estudio de la Sensibilidad

Con el objeto de establecer la relación entre el tiempo de calentamiento y la sensibilidad de la reacción se practicaron una serie de ensayos en igualdad de condiciones para distintas concentraciones de estricnina, estableciendo para cada concentración el tiempo mínimo requerido para que el ensayo resultara positivo.

* Trabajo presentado en homenaje al prof. *H. Lieb*.

Reactivos utilizados

1. Cinc puro en pequeñas granallas o laminillas.

2. Solución de cloruro mercúrico al 10% en ácido clorhídrico concentrado.

3. Solución nitrito de sodio $0{,}5^0/_{00}$.

La reacción se efectúa siguiendo las indicaciones de *Denigès*[2] colocando en un tubo de ensayo 1 ml de la solución acuosa de estricnina, 1 g de granallas de cinc y 1 ml de la solución de cloruro mercúrico clorhídrica y colocando el tubo en un baño maria a 100°. Transcurrido 1 minuto se retiró una gota con una pipeta y se trasladó a una piedra de toque, donde se completó la reacción añadiendo una gota de la solución de nitrito, observando si había o no coloración y su intensidad, a los 2, 5, 7, 10, 12 y 15 minutos se repite la extracción y completa el ensayo como se indicó.

En el cuadro siguiente se consignan los resultados obtenidos con diluciones que varian entre 1 : 2000 y 1 : 300000. La intensidad del color obtenido se indica por el número de cruces.

Cuadro N° I

Diluciones	Tiempo de calentamiento en minutos						
	1	2	5	7	10	12	15
1 : 2000	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 10000	—	—	+	+++	++++	++++	++++
1 : 25000	—	—	—	+	+++	++++	++++
1 : 50000	—	—	—	—	+	+++	+++
1 : 100000	—	—	—	—	—	++	++
1 : 200000	—	—	—	—	—	+	+
1 : 300000	—	—	—	—	—	—	+

Procedimiento propuesto para practicar la reacción hidroestrícnica en microescala

Para la denominada reacción hidroestrícnica, la aplicación de las clásicas técnicas de *Emich*[15] trabajando con tubos capilares, no puede efectuarse en forma corriente, puesto que el abundante desprendimiento de hidrógeno producido por la primera fase de la reacción, expulsa al líquido contenido en el capilar. Por lo cual se imaginó una técnica que, sin apartarse de la escala micro, permite la salida de los gases desprendidos y, una vez finalizada la reducción, se completa la reacción en el otro extremo del mismo capilar.

Reactivos necesarios

1. Solución de cloruro mercúrico 10% en ácido clorhídrico concentrado.
2. Cinc en gránulos del tamaño ligeramente mayor que una cabeza de alfiler o mejor tirillas de 10 mm de largo por 1 a 2 de ancho dobladas en dos.
3. Solución de nitrito de sodio al 0,50 por mil.

Tecnica

Se estira un tubo de vidrio blanco incoloro (los que presentan tinte verdoso hacen disminuir la sensibilidad, pues anulan el color rosado por ser colores complementarios) formando un capilar de 1 a 2 mm de diámetro y unos 10 cm de largo; se corta y estira uno de los extremos del capilar para formar una pipeta, Fig. 1*a*. Se funde y estira luego la porción inmediata al nacimiento del capilar, de modo que forme un bulbo de unos 3 a 5 mm de ancho por 1,5 a 2 cm de largo, Fig. 1*b*. Luego se corta y descarta el capilar previamente preparado con una pequeña porción del bulbo, de modo que quede un orificio suficiente para introducir el cinc, Fig. 1*c*, a continuación se permite entrar por capilaridad unos 8 a 10 μl de la solución acuosa de estricnina y otro tanto de la solución de bicloruro de mercurio clorhídrico, Fig. 1*d*. Mediante nuevos golpecitos se hace correr el líquido al interior del capilar (sin llegar al bulbo) en este momento se introducen dos tirillas de cinc dobladas o trocitos, en la parte ensanchada del capilar, cuidando que el líquido no se corra ni hacia el extremo ni hacia la parte ensanchada; esto se puede solucionar apoyando un trocito de goma en la punta del capilar, Fig. 1*e*. Manteniendo el tubo capilar en posición horizontal se cierra la parte ensanchada, directamente o con ayuda de un pinza, de manera que se forme un bulbo; el cinc no debe ser calentado porque se puede fundir o volatilizar y oxidarse parcialmente, Fig. 1*f*.

Luego de que se enfria el microbaloncito así preparado, se procede a centrifugar el líquido al fondo del bulbo y se coloca en un baño maria hirviente por 15 minutos, especialmente para soluciones muy diluidas, segun se ha señalado oportunamente; se retira y se cierra a la llama por el extremo fino del capilar, Fig. 1*g*. Luego se centrifuga el líquido del bulbo hacia el capilar y se corta separando el bulbo, Fig. 1*h*. Mediante una pipeta capilar fina, se introducen 1 a 3 μl de la solución de nitrito de sodio al 0,50 por mil, Fig. 1*i*. Se centrifuga para reunirlo con la solución hidroestrícnica en el fondo del capilar. Si la solución de estricnina es de concentración superior a 1 : 80000, ya se observan nitidamente la coloración rosada contra un fondo blanco.

Para concentraciones más débiles, conviene cerrar a la llama el capilar, a 1 o 1,5 cm de la superficie del líquido y centrifugar de uno a otro extremo

para mezclar bien. La observación en este caso deberá hacerse en las condiciones señaladas por *Luís* y *Niederl*[16] y que se reproducen: "La observación debe hacerse por el eje del tubito; para concentraciones débiles conviene enrollar en el tubito capilar un papel de filtro humedecido

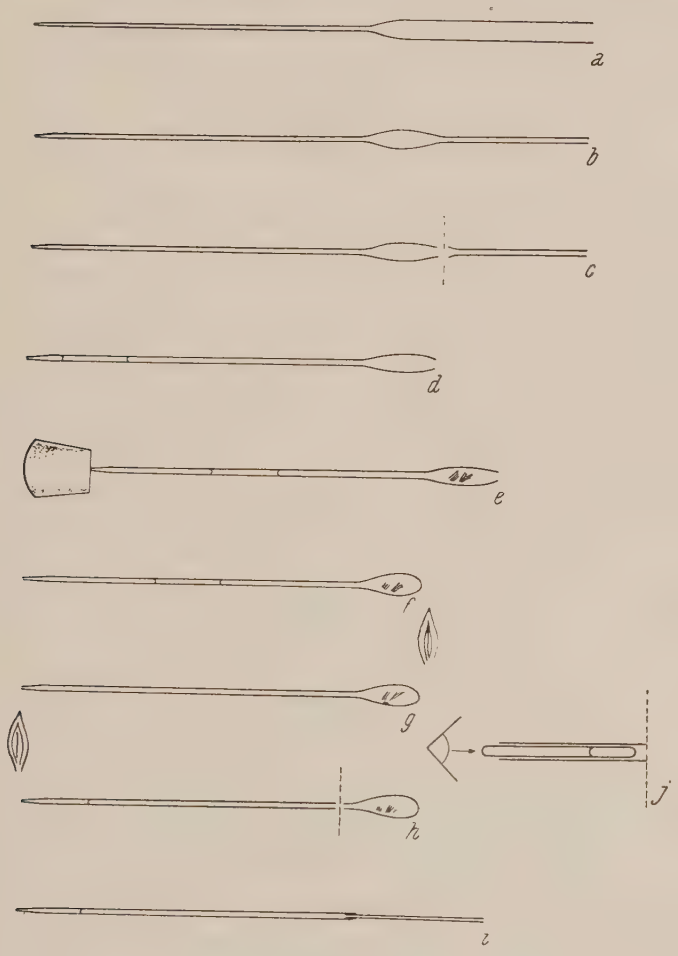


Fig. 1

para facilitar la adherencia y luego se observará utilizando luz proveniente de una lampara comun de microscopio, atenuada por filtración a través de un papel filtro".

Es necesario insistir en la necesidad de trabajar con vidrio incoloro, en caso contrario se sugiere una alternativa que da muy buenos resultados: llegado el momento en que se ha obtenido el centrifugado en el capilar

Fig. 1*h*, se separa el bulbo y corta la punta del capilar, transfiriendo el líquido por capilaridad a una pipeta capilar fabricada con vidrio de ampollas para inyectables, que aunque es duro, presenta gran transparencia. Previa a la introducción de la solución hidroestrícnica se llena por capilaridad la pipetita capilar con la solución de nitrito y luego se la expulsa apoyando la punta sobre un papel de filtro, de este modo quedan en el capilar vestigios de nitrito suficientes para producir la coloración rosa.

Sensibilidad 0,05 μg en 10 μl.
Concentración límite 1 : 200000.

Respecto a la concentración límite se ha comprobado que diluciones superiores a las señaladas entran en la zona de las reacciones inseguras.

Método alternativo

La parte final de la reacción se puede efectuar de la siguiente manera que importa una modificación a la técnica original: Se coloca en una cápsula de porcelana blanca una minúscula gota de la solución de nitrito de sodio y se evapora a baño maria, sobre este residuo se deposita el líquido final de la reducción (Fig. 1*h*) y se lleva al baño maria hasta sequedad. Para concentraciones relativamente altas, la gota se colorea de rosado aún antes de evaporar, para débiles concentraciones se observa en los bordes de la gota evaporada una coloración rosada.

Sensibilidad 0,02 μg en 10 μl.
Concentración límite 1 : 500000.

Aplicaciones

Directamente sobre vegetales

Teniendo en cuenta la especificidad y la sensibilidad de la reacción hidroestrícnica, así como lo práctico del método propuesto y descripto anteriormente, se decide ensayarlo para determinar la estricnina directamente en drogas vegetales.

Habiendo en el reactivo hidrogenante ácido clorhídrico puro, se pensó que el mismo serviría para efectuar la extracción del alcaloide y se ensayó entonces la técnica que se propone en este trabajo, introduciendo: en el capilar solamente la solución reactivo (cloruro mercúrico en clorhídrico concentrado) y en el bulbo, junto con el cinc, pequeñisimas cantidades del vegetal (se trabajó con nuez vómica) pulverizada.

Se tropezó en principio con dos dificultades:

1. A veces se carbonizaba el vegetal en el momento de cerrar el bulbo.
2. Cuando la cantidad de vegetal que se utilizaba era muy abundante, absorbía mucho reactivo y se dificultaba la reacción.

Se solucionó el primer inconveniente haciendo el bulbo mas largo, para poder mantener el vegetal mas lejos del extremo a soldar. En cuanto al segundo basta con reemplazar a la solución de estricnina, por igual cantidad de agua destilada, o colocando el doble de la solución reactiva de lo que se indicara en el capitulo correspondiente. Se obtienen reacciones francamente positivas hasta con rastros de nuez vómica apeñas visibles.

Hay que tener presente, que después del calentamiento se observa que el líquido se colorea muy ligeramente en amarillo parduzco, pero esto no molesta para la observación final de la reacción.

En preparados farmaceuticos

Se ensayó el método propuesto en este trabajo, en la identificación de la estricnina en una tintura de nuez vómica. Se procedió como si se tratara de una solución de estricnina, ya que la coloración propia de la tintura no molesta para la observación final. La reacción dió intensa coloración.

En toxicologia

(Investigación de la estricnina en extractos viscerales)

Dos residuos provenientes de la extracción de alcaloides en otras tantas visceras, se adicionaron de 10 μg de estricnina, disueltos en 5 ml de cloroformo.

Se procedió luego a tomar porciones de 1 ml de la solución clorofórmica y se evaporaron en sendos vidrios de reloj. En uno de los residuos así divididos, se investigó la presencia de alcaloides mediante el reactivo de *Mayer*: se disolvió el residuo en una gota de ácido clorhídrico 0,3 N y se le añadió 1 microgota del reactivo; en ambos residuos se obtuvo resultado positivo débil, pero neto.

Otro de los residuos se disolvió tambien en una gota de acido clorhídrico, 0,3 N, debe tenerse la precaución de mojar cuidadosamente todo el residuo con el líquido ácido. Se practica la reacción hidroestrícnica con el modo operatorio señalado oportunamente, utilizando 10 μl de solución.

En los dos casos se obtuvo reacción netamente positiva. En una pericia en que se solicitaba la investigación de estricnina en unos ml de líquido acuoso putrefacto y en un jarro que contenía petrolato líquido, se procedió, en el primer caso a extraer directamente con cloroformo en medio alcalino, utilizando un tubo de centrifuga, la solución cloroformica se repartió en varios vidrios de reloj. En el jarro se trató con ácido clorhídrico diluido y caliente, se filtró por papel húmedo para eliminar el petrolato y el líquido acuoso remanente alcalinizado de extrajo con cloroformo, que también se repartió en varios vidrios se

reloj. En ambos casos se ensayaron las reacciones con los reactivos generales de los alcaloides resultando negativas, solo el reactivo de *Mayer* dió leve turbidez.

El residuo de otro de los vidrios de reloj se disolvió en una gota de ácido clorhídrico 0,3 N y con 10 a 20 μl de esta disolución se practicó la reacción. Se obtuvo resultado netamente positivo en ambos casos. Para mayor seguridad se hicieron ensayos en blanco omitiendo la reducción, completado el ensayo con nitrito no se obtuvo color alguno. (Las constancias sumariales, informe médico y el hallazgo de un frasco conteniendo cristales de sulfato de estricnina corroboraron la exactitud de la investigación.)

Conclusiones

Se establece que para soluciones muy diluidas de estricnina es necesario que la fase de hidrogenación se prolongue hasta 15 minutos en la reacción de *Malaquin* y *Denigès*.

Se propone una técnica en escala micro para la reacción hidroestrícnica que permite reconocer 0,05 μg de estricnina en 10 μl. Asímismo se presenta una modificación original que aumenta la sensibilidad a 0,02 μg en 10 μl.

La técnica propuesta se adapta muy bien a la investigación directa de la estricnina en el polvo de nuez vómica y diversos preparados farmaceuticos.

Se obtienen excelentes resultados en la investigación de estricnina en los extractivos viscerales provenientes del método de *Stas* y *Otto*.

Zusammenfassung

Die Strychninprobe von *Malaquin* und *Denigès* wurde zu einem Mikronachweis umgestaltet, der noch 0,02 μg dieses Alkaloides nachzuweisen gestattet.

Summary

The reaction of *Malaquin* and *Denigès* for strychnine was converted into a microprocedure allowing the detection of 0.02 μg of this alkaloid.

Résumé

La réaction d'identification de la strychnine de *Malaquin* et *Denigès* a été transformée en technique microanalytique permettant de déceler 0,02 μg de cet alcaloïde.

Bibliografia

[1] *P. Malaquin*, J. pharmac. chim. **301**, 289 (1909).

[2] *G. Denigès*, Bull. soc. chim. France **9**, 218 (1868).

[3] *A. Corazza*, Thesis F. C. Médicas Buenos Aires, 1957.

[4] *K. H. Bauer*, Analytische Chemie der Alkaloide. Berlin: Bornträger. 1921. pág. 33.

[5] *A. Chapuis*, Précis de toxicologie, III. ed. Paris: Baillière. 1897. pág. 603.
[6] *R. Douris*, Toxicologie moderne à l'usage des étudiants en medicine et en pharmacie, II. ed. Paris: Vigot. 1951.
[7] *G. Dragendorff*, Manuel de toxicologie, II. ed. publ. par Dr. *L. Gautier*. Paris: F. Sary. 1886.
[8] *R. Fabre*, Leçons de toxicologie, Fasc. VIII, alcaloides, 2º parte. Paris: Hermann. 1935. pág. 57.
[9] *C. R. Fresenius*, Précis d'analyse chimique qualitative, par *R. Fresenius*, XII. ed. Paris: Masson. 1922. pág. 778.
[10] *A. François*, Bull. soc. pharm. Bordeaux **68**, 158 (1930).
[11] *E. Kohn-Abrest*, Précis de toxicologie, II. ed. Paris: Doin. 1948. pág. 358.
[12] *J. Ogier*, Traité de chimie toxicologique, II. ed. Paris: Doin. 1924. pág. 260.
[13] *F. Dee Snell* y *Cornelia T. Snell*, Colorimetric Methods of Analysis, III. ed. T. 2º. New York: Van Nostrand Co. 1936. pág. 516.
[14] Scott's Standard Methods of Chemical Analysis, V ed. New York: Van Nostrand Co. 1939. pág. 1957.
[15] *F. Emich*, Lehrbuch der Mikrochemie. München: Bergmann. 1926.
[16] *P. Luis* y *J. B. Niederl*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 948.

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mikrobestimmung primärer Aminogruppen mit Nitrosylbromid*

Von

Gerald Kainz, Hans Huber und Franz Kasler

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Juni 1957)

Wie *van Slyke*[1] gezeigt hat, kann man primäre Aminogruppen durch Desaminierung mit salpetriger Säure gasvolumetrisch bestimmen. *Van Slyke* fand allerdings, daß hierbei einige Aminosäuren, wie Glycin und Cystin, Resultate ergeben, die wesentlich über den berechneten Werten liegen. Später wurden auch bei Tyrosin, Tryptophan und Serin[2] positive Fehlresultate festgestellt, ohne daß hierfür eine Ursache angegeben werden konnte. Besonders überraschend war, daß einige Verbindungen, die überhaupt keine primäre Aminogruppe besitzen, wie Oxime von Gallensäurederivaten[3], Phenole[4] und Malonsäure[5], ein Stickstoffvolumen liefern.

In früheren Arbeiten[6–8] haben wir uns mit der Aufklärung dieser Fehlresultate beschäftigt und fanden, daß die Anomalie der oben erwähnten Aminosäuren nur ein kleiner Ausschnitt aus einer größeren Gruppe von Anomalien ist. Insgesamt haben wir 9 Verbindungsklassen ermittelt, die alle einen positiven „Aminostickstoffwert" nach *van Slyke* ergeben, ohne daß eine primäre Aminogruppe vorhanden ist. Es sind dies:

1. Isonitrosoverbindungen,
2. Verbindungen mit aktiver Methylengruppe,
3. Monohalogenessigsäuren,
4. Phenole bzw. Nitrosophenole,
5. durch salpetrige Säure oxydierbare Schwefelverbindungen,
6. Indol- und Oxindolverbindungen,

---

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *F. Wessely* in Verehrung und Dankbarkeit zum 60. Geburtstag gewidmet.

7. fünfgliedrige Heterocyklen mit Harnstoffgruppierung,
8. hydrolytisch aufspaltbare Verbindungen,
9. Lactame, die eine unbeständige Nitrosoverbindung bilden.

Wir fanden weiters, daß bei der Desaminierung von Aminen gelegentlich durch Nebenreaktionen eine der obigen Verbindungen entsteht, die dann anomal weiterreagiert. Auf diese Weise konnte die Anomalie von Glycin[9], Serin und Threonin erklärt werden.

Es zeigte sich ferner, daß es neben den positiven Anomalien auch negative Anomalien gibt, bei denen die Aminostickstoffbestimmung mit salpetriger Säure zu tief ausfällt. Hierfür haben wir folgende Ursachen ermittelt:

1. schlechte Diazotierbarkeit des primären Amins,
2. Bildung relativ beständiger Diazoniumsalze,
3. Nebenreaktionen der intermediär gebildeten Diazoniumsalze,
4. schwer lösliche Verbindungen.

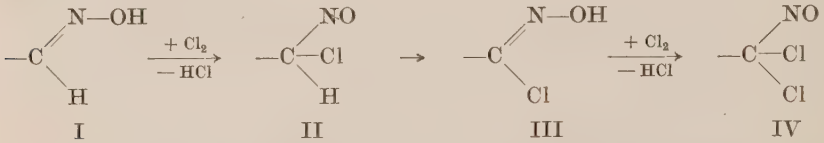
Angesichts des großen Umfanges an anomal reagierenden Verbindungen schien es vom analytischen Standpunkt aus überaus wünschenswert, eine eventuell vorliegende Anomalie bei unbekannten Analysensubstanzen einerseits erkennen und anderseits auch ausschalten zu können.

Wir[7] haben bereits gezeigt, daß eine *Erkennung* der positiven Anomalien möglich ist und daraus gefolgert, daß eine quantitative Aminostickstoffbestimmung nur dann zuverlässig ist, wenn das Resultat mit verd. Nitritlösung (in Anwesenheit von Jodid) erzielt wurde. Hingegen ist das Ergebnis unsicher, wenn das Resultat mit konz. Nitritlösung erreicht wurde. Eine weitere Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Aminostickstoffbestimmung mit wäßriger Nitritlösung war uns trotz verschiedener Versuche nicht möglich.

Um den Anwendungsbereich der Bestimmung zu erweitern, haben wir in der vorliegenden Arbeit einen anderen Weg beschritten. Hierzu versuchten wir, die einzelnen charakteristischen Gruppen, die in den oben erwähnten Verbindungsklassen der positiven Anomalien auftreten, durch chemische Reaktionen zu blockieren, so daß sie in der Folge nicht mehr Anlaß zu einer anomalen Gasentwicklung geben konnten.

Aus verschiedenen Gründen schien uns Brom ein geeignetes Agens: so werden damit beispielsweise aktive Methylengruppen (Gruppe 2) leicht bromiert und verhalten sich dann negativ gegenüber salpetriger Säure. Auch bei Phenolen (Gruppe 4) ist durch Zusatz von Brom eine Blockierung jener Stellen möglich, an denen sonst eine Nitrosogruppe eintritt. Weiters werden durch Brom auch solche Schwefelverbindungen (Gruppe 5), die zufolge ihrer leichten Oxydierbarkeit salpetrige Säure zu Stickoxyden reduzieren, oxydiert und scheiden dadurch als anomale Gruppe aus.

Für die weitere Erprobung von Brom war das Verhalten der Isonitrosoverbindungen (Gruppe 1) entscheidend, da die Isonitrososstufe auch von den Gruppen 2, 3 und 4 durchlaufen wird. Hierbei kam uns eine Arbeit von *Piloty* und *Steinbock*[10] zugute, die fanden, daß Aldoxime (I) durch Halogen in die entsprechenden Chlorisonitrosoverbindungen (II) übergeführt werden, die sich dann in die isomeren Hydroxamsäurechloride (III) umlagern. Bei Überschuß von Halogen tritt weitere Reaktion zu IV ein.



I II III IV

Bedingung für diese Reaktion ist wasserfreie Phase. Führt man hingegen die Reaktion in Anwesenheit von Wasser aus (*Piloty* und *Stock*[11]), so entsteht unter N_2O-Entwicklung das entsprechende Keton. Da N_2O nur äußerst schwierig aus dem Gasstrom zu entfernen ist, war es nötig, zur Ausschaltung der Anomalie der Isonitrosoverbindungen in wasserfreier Phase zu arbeiten. Wir wählten aus Gründen, die weiter unten angeführt sind, Eisessig und konnten damit die Anomalie der Isonitrosoverbindungen beseitigen.

Da demnach die Anwesenheit von Wasser in der Desaminierungslösung vermieden werden mußte, gingen wir von wäßriger salpetriger Säure ab und wählten Nitrosylbromid in Eisessig als desaminierendes Agens.

Fraglich war noch das Verhalten der Gruppen 6 bis 9 (Indol- und Oxindolverbindungen, fünfgliedrige Heterocyklen mit Harnstoffgruppierung, hydrolytisch aufspaltbare Verbindungen; Lactame, die eine unbeständige Nitrosoverbindung bilden). Zu unserer Überraschung zeigte sich aber, daß diese Verbindungen ebenfalls keine Anomalien zeigen, wenn sie in wasserfreier Phase in Anwesenheit von Brom einer Nitrosierung unterworfen werden.

Auf Grund dieser experimentellen Befunde war es also möglich, sämtliche positiven Anomalien, soweit sie bisher mit wäßriger Nitritlösung bekannt geworden sind, zu eliminieren.

Wichtig war weiters die Untersuchung der *negativen* Anomalien, die zum Teil bei der ursprünglichen van-Slyke-Bestimmung nur langsam Stickstoff entwickeln, zum Teil überhaupt zu tiefe Werte verursachen.

In einer früheren Arbeit[12] konnten wir zeigen, daß man bei vielen Verbindungen die Reaktionszeit durch kurzes Erhitzen von bisher einigen Stunden auf etwa 45 Minuten reduzieren kann; bei den unter 1 bis 4 angefärbten Substanzen gelang es uns trotzdem nicht, befriedigende Werte zu erhalten.

Bei der Desaminierung in Eisessig waren jedoch von vornherein günstigere Verhältnisse zu erwarten, da Diazotierungen in wasserfreien Säuren wesentlich besser verlaufen als in wäßriger Lösung. Mit Nitrosylbromid in Eisessig ergab sich sogar bei Zimmertemperatur eine derartige Beschleunigung der Desaminierung, daß im allgemeinen ein Erhitzen der Reaktionslösung nicht notwendig wurde. Darüber hinaus gelang es auch, die Verbindungen der Gruppen 1 und 4, wenngleich auch bei etwas verlängerter Reaktionszeit, zu desaminieren. Darunter fallen vor allem die Säureamide, die bisher mit Ausnahme von Harnstoff und Glutamin nur in sehr geringem Ausmaße desaminiert werden konnten. Hingegen waren auch in Eisessig die negativen Anomalien der Gruppen 2 und 3 nicht behebbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich primäre Amine mit Nitrosylbromid in Eisessig in Gegenwart eines Überschusses von Brom wesentlich vorteilhafter bestimmen lassen als in wäßriger Lösung, da hierbei alle positiven Anomalien, die vergleichsweise in wäßriger Nitritlösung beobachtet wurden, wegfallen. Bei den negativen Anomalien trat zwar eine Verbesserung der Resultate ein, doch gelang keineswegs die restlose Ausschaltung dieser Anomalien.

Experimenteller Teil

Apparatur

I. Zur Desaminierung wird die bereits früher beschriebene Apparatur[12] verwendet (Abb. 1). Sie besteht aus der Reaktionseprouvette (*1*), dem Einleitungsrohr (*2*), dem Patenthahn (*3*), der Zuführungsleitung (*4*), dem Tropftrichter (*5*), dem Entlüftungshahn (*6*), dem Wäscher (*7*) und dem U-Rohr (*8*). An Stelle des früher beschriebenen Spiralwäschers kann auch ein Kugelwäscher (*7*) verwendet werden, da dessen Handhabung für angelernte Kräfte leichter scheint. Am Azotometer wird vorteilhaft ein Patenthahn zur Entlüftung vor der Bestimmung sowie zum Auswaschen der Apparatur nach der Bestimmung angebracht. Weiters erwies es sich bei Verwendung von Nitrosylbromid als zweckmäßig, den Entlüftungshahn (*6*) als Patenthahn auszubilden, da dadurch eine schnellere Trocknung des vorderen Teiles der Apparatur möglich ist.

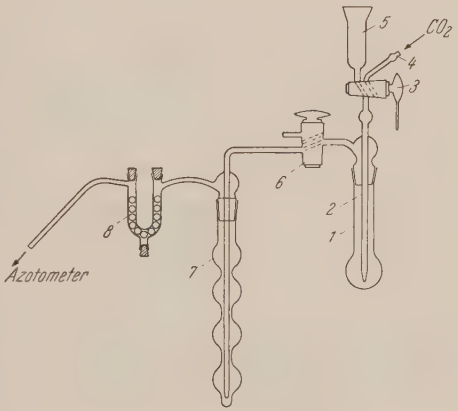


Abb. 1

II. In Abb. 2 ist die Vorratspipette dargestellt, in der die Nitrosylbromidlösung luftfrei gespült und aufbewahrt wird. Die Vorratspipette besteht aus dem Hahn (*1*), dem Schliffstopfen (*2*), der Eprouvette (*3*), dem Patenthahn (*4*) und dem Schliff (*5*). Mittels (*5*) wird sie mit dem Tropftrichter (*5*) der Abb. 1 verbunden. Zur Schmierung der Hähne wird Silicon verwendet.

III. Der Ansatz (*4*) der Abb. 1 und der Ansatz (*1*) der Abb. 2 ist mit PVC-Schlauch über ein T-Stück mit der Kohlendioxydquelle verbunden.

Herstellung der Nitrosylbromidlösung. In einer Eprouvette werden unter dem Abzug 15 ml Eisessig mit 3 ml Brom versetzt, 2 g festes Natriumnitrit eingetragen und die entstandene schwarzbraune Lösung in die getrocknete Vorratspipette übergefüllt. Nach Anschließen der Pipette an die Apparatur I bringt man einige Milliliter Ameisensäure-Natriumformiatlösung in das Reaktionskölbchen (*1*) und leitet 30 Minuten lang Kohlendioxyd durch die Nitrosylbromidlösung. Das Nitrosierungsreagens ist nunmehr gebrauchsfertig und bleibt ständig mit der Apparatur I verbunden. Diese wird sodann gewaschen, indem der Patenthahn des Azotometers über einen Schlauch mit einer Schale Wasser verbunden und vom Ansatzstück (*4*) her mit einer Vakuumpumpe angesaugt wird. Zur schnellen Trocknung des Reaktionskölbchens gibt man in dieses etwa 4 ml Alkohol, stellt den Patenthahn (*6*) in Richtung Außenluft und dreht den CO_2-Strom voll auf. Hierdurch wird der Alkohol an den Wänden der Reaktionseprouvette emporgeschleudert. Dasselbe wiederholt man mit Aceton und saugt schließlich Luft durch die Reaktionseprouvette.

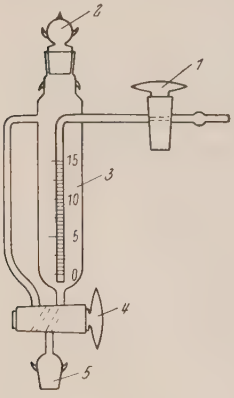


Abb. 2

Durchführung der Bestimmung. Zunächst wird der Wäscher (*7*) mit Bromat-Schwefelsäure beschickt; diese stellt man unmittelbar vor der Analyse durch Vermischen von 5 ml 7,5%iger Natriumbromatlösung mit 5 ml 50%iger Schwefelsäure unter Kühlen her. Dann werden die Perlen des U-Rohres (*8*) mit gesättigter Thiosulfatlösung benetzt. In gleicher Weise kann man auch Ameisensäure, die zu gleichen Teilen mit 20%iger Natriumformiatlösung versetzt ist, verwenden.

Sodann bringt man in das Reaktionskölbchen etwa 2 bis 3 mg Einwaage und leitet über das Ansatzstück (*4*) solange CO_2 durch die Apparatur, bis im Azotometer Mikroblasen aufscheinen (zirka 10 Minuten). Zur Desaminierung läßt man aus der Vorratspipette 2 ml Nitrosylbromid-Eisessiglösung zufließen und leitet dann Kohlendioxyd im Tempo von 10 Blasen/10 sek ein. Nach etwa 20 bis 25 Minuten treten im Azotometer

wieder Mikroblasen auf. Lediglich bei äußerst schwer desaminierbaren Verbindungen ist es nötig, den Versuch auf 50 Minuten auszudehnen.

Nach beendeter Bestimmung saugt man durch die Apparatur, wie vorhin beschrieben, Wasser. Auf diese Weise ist es möglich, sämtliche Bestimmungen ohne Belästigung durch Bromdämpfe durchzuführen.

In gleicher Weise wird zu Beginn der Tagesserie der Blindwert der Nitrosylbromidlösung ermittelt und vom jeweils gefundenen Azotometervolumen der Bestimmung abgezogen. Die Berechnung erfolgt analog wie bei der van Slyke-Bestimmung.

Wir danken der Österreichischen Gesellschaft für Mikrochemie für die Gewährung eines Forschungsstipendiums (*H. H.* und *F. K.*).

Zusammenfassung

Es wird über eine neue Methode zur Bestimmung primärer Aminogruppen berichtet, bei der die positiven Anomalien, die bisher bei Verwendung wäßriger Nitritlösung beobachtet wurden und die das Resultat verfälschten, eliminiert werden. Als desaminierendes Agens wird Nitrosylbromid verwendet. Die störenden Gruppen werden mit Brom-Eisessig bromiert und dadurch ausgeschaltet. Teilweise konnten auch die negativen Anomalien, die bei Verwendung wäßriger Nitritlösung auftraten, behoben werden.

Summary

A report is given of a new method of determining primary amino groups, in which the positive anomalies, which heretofore have been observed when aqueous nitrite solution is used and which vitiated the results, have been eliminated. Nitrosyl bromide is used as deaminating agent. The disturbing groups are brominated by means of bromine-glacial acetic acid and thus rendered harmless. The negative anomalies, which appear when aqueous nitrite solution is used, were also partially eliminated.

Résumé

Compte-rendu d'une nouvelle méthode de dosage des groupements amines primaires grâce à laquelle sont éliminées les anomalies positives faussant les résultats que l'on constatait auparavant lors de l'emploi de la solution aqueuse de nitrite. L'agent désaminant employé est le bromure de nitrosyle. Les groupements gênants sont bromés par le mélange brome-acide acétique glacial de sorte qu'ils n'apportent aucune perturbation. Il a été également possible de remédier partiellement aux anomalies négatives qui apparaissaient lors de l'emploi de la solution aqueuse de nitrite.

Literatur

[1] *D. D. van Slyke* in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 1, Teil 7, S. 263ff. Wien: Urban & Schwarzenberg. 1925.
[2] *C. L. A. Schmidt*, J. Biol. Chemistry **82**, 587 (1929).

[3] *M. Schenck* und *J. Reschke*, Z. physiol. Chem. **268**, 267 (1941); **282**, 88 (1947).
[4] *H. E. Carter* und *S. R. Dickman*, J. Biol. Chemistry **149**, 571 (1943).
[5] *M. A. Abdel-Akher* und *W. M. Sandström*, Arch. Biochemistry **30**, 407 (1951).
[6] *G. Kainz* und *F. Schöller*, Naturwiss. **42**, 209 (1955).
[7] *G. Kainz* und *F. Schöller*, Z. physiol. Chem. **301**, 259 (1955).
[8] *G. Kainz* und *F. Schöller*, Biochem. Z. **327**, 292 (1955).
[9] *A. T. Austin*, J. Chem. Soc. London **1950**, 149.
[10] *O. Piloty* und *H. Steinbock*, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3101 (1902).
[11] *O. Piloty* und *A. Stock*, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3093 (1902).
[12] *G. Kainz*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 349.

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien und dem Institut für anorganische und analytische Chemie (Mikroanalyse) der Technischen Hochschule Wien

Zum Nachweis des Fluorions*

Von

H. Ballczo und **H. Weisz**

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 21. Juni 1957)

Schon lange kennt man das Prinzip der Ausbleichreaktionen der verschiedensten Metallfarblacke durch Fluorion. Immer kommt es darauf an, die Farbschwächung des betreffenden Farblackes zu erkennen. Dies kann visuell mit einer Vergleichsprobe und instrumentell mit Spektralphotometern geschehen, will man auch kleinere Fluormengen erkennen. Von den Metallfarbverbindungen sind zweifellos die des Aluminiums am geeignetsten, da — geringe Dissoziation des Farblackes vorausgesetzt — dieses bei Anwesenheit von Natriumionen die stabilsten Fluorkomplexe liefert. Für die Aluminiumlackbildung sind vor allem Farbstoffe vom Typus des Triphenylmethans besonders geeignet und immer wieder verwendet worden[1,2].

Versetzt man eine schwach saure Lösung (p_H 3 bis 5) des blauen Aluminium-Chromazurol S-Komplexes[2] mit einer Fluoridlösung, so kann man trotz geringen oder gar keines Farbschwächungseffektes den durch die Komplexbildung mit den Fluorionen freigewordenen Farbstoffanteil mit Äther extrahieren und so noch kleinste Mengen Fluorionen erkennen. Diese Extraktion gelingt auch mit Isoamylalkohol, wobei der Farbstoff ebenfalls mit schwach gelber bis orangeroter Farbe in Lösung geht. Trockener Farbstoff ist auch in Äthylalkohol löslich. Auf diese Weise gelang es uns auch, einen möglichst reinen Aluminium-Chromazurol S-Komplex zu erhalten, indem wir die mit einem Farbstoffüberschuß versetzte Aluminiumlösung von diesem Überschuß durch Extraktion mit Äther befreiten.

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *H. Lieb* zum 70. Geburtstag ergebenst gewidmet.

Dies bewog uns zu versuchen, mit Hilfe der Ringofentechnik[3] einen empfindlichen Fluornachweis zu entwickeln. Tatsächlich fanden wir, daß ein auf Papier aufgebrachter trockener Fleck von Aluminium-Chromazurol S durch kontinuierliches Auswaschen mit absolutem Alkohol keinen Farbring liefert. Der durch das Fluorion am Papier freigesetzte Farbstoff ist hingegen in Alkohol löslich und ergibt daher einen scharfen rosaroten Ring. Die Ringofenmethode ermöglichte auch die Erprobung weiterer Extraktionsmittel, wie Benzol und Toluol; der Äther eignet sich wegen seines hohen Dampfdruckes am wenigsten für diese Technik. Da es in unserem Falle nur darauf ankam, aus trockenen Aluminiumfarbverbindungen — nach der Reaktion mit dem fluorhaltigen Probetropfen wurde das Wasser stets durch Trocknen bei 60 bis 70° C beseitigt — zu extrahieren, war es nicht nötig, ein mit Wasser unmischbares Extraktionsmittel anzuwenden. Auf diese Weise wird es möglich, auch kleine Mengen freien Farbstoff (entsprechend einer nur sehr kleinen Fluormenge) trotz großen Farblacküberschusses sichtbar zu machen; eine Methode, die gerade mit dem Ringofen am einfachsten durchzuführen ist.

Bereitung der Farblacklösung

6 ml einer sauren Chromazural S-Lösung (0,15 g Chromazurol S* in 5 ml 0,1-n HCl gelöst ad 50 ml H_2O) werden mit 1 ml m/60 Aluminiumchlorid ($p_H \sim 3$) und 2 ml Pufferlösung mit dem $p_H \sim 4{,}3$ (32 g NH_4Cl und 200 ml H_2O und 40 ml CH_3COOH und 10 ml konz. NH_4OH kühlen und mit NH_4OH auf $p_H \sim 4{,}3$ einstellen, auf 300 ml mit H_2O verdünnen)[2] versetzt und mit Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Am nächsten Tag wird die Lösung von der meist stark emulgierten Ätherschichte ohne Schwierigkeit abgetrennt. Die so vom überschüssigen Chromazurol S befreite Farblacklösung wird mit gleichem Volumen einer 20%igen Natriumnitratlösung versetzt.

Herstellung des Reagenspapieres

Diese Aluminium-Chromazurol S-Lösung (25 μg Al/ml) wird mit Hilfe einer Kapillarpipette in die Mitte eines Rundfilters (5,5 cm Durchmesser, Schwarzband, Schleicher und Schüll) derart aufgetragen, daß Flecken von etwa 10 mm Durchmesser entstehen. Die so imprägnierten Papiere werden bei 60 bis 70° C getrocknet. Ein höheres Erhitzen führt zur teilweisen Dissoziation der Farblackverbindung. Der richtig getrocknete Fleck muß rein blau gefärbt sein. Eine Veränderung des Farbtones nach violett wird nicht nur durch Trocknung bei zu hoher Temperatur, sondern auch durch Säuredämpfe (konz. HCl ebenso wie HNO_3) verursacht. Die so vorbereiteten Filterpapiere sind gut haltbar.

* Geigy, Basel.

Durchführung der Probe

Der schwach alkalische Probetropfen wird in die Probekapillare, eine selbstfüllende Kapillarpipette mit 1 bis 2 μl Inhalt[3], aufgenommen und mit dieser Kapillare 3 Sekunden über Eisessigdampf geräuchert, indem man sie in die Öffnung der Reagensflasche (Breithals) hält. Hernach wird dieser Probetropfen in die Mitte eines auf dem Filter vorbereiteten blauen Aluminium-Chromazurol S-Fleckes aufgetragen, bei 60 bis 70° C reagieren gelassen und getrocknet. Sodann wird das Filter auf den Ringofen aufgelegt und der bei Anwesenheit von Fluor freigesetzte Farbstoff durch kontinuierliche Extraktion (5 bis 10 Minuten lang) mit Äthylalkohol in die Ringzone gewaschen. Statt absoluten Äthylalkohols kann man 96%igen Alkohol verwenden, wobei allerdings eine Blindprobe ausgeführt werden muß. Ein je nach der Fluormenge mehr oder weniger intensiv rosarot gefärbter scharfer Ring zeigt Fluor an.

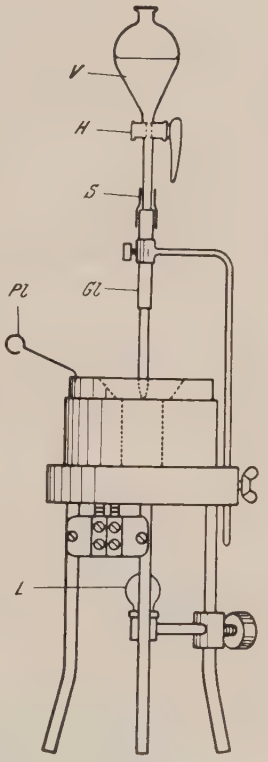


Abb. 1

Kleine Mengen des Farbstoffes sind wegen seiner geringen Färbekraft oft nur schwer zu erkennen. Besprüht man jedoch die so erhaltene Ringzone nach dem Trocknen mit einer sauren Aluminiumchloridlösung, räuchert *kurz* über Ammoniak und trocknet wieder bei 60 bis 70° C, so entsteht ein nunmehr besser sichtbarer blauer Ring von Aluminium-Chromazurol S. Die Erfassungsgrenze der Reaktion beträgt 0,005 μg Fluor. Hier wie bei allen Ausbleichreaktionen stört die Anwesenheit auch anderer Komplexbildner und die der Phosphate.

Zur „kontinuierlichen" Extraktion verwendeten wir eine kleine Kapillarpipette (Abb. 1) mit Vorratsgefäß *V* und Einstellhahn *H*, die wir mittels eines kleinen Schlauchstückchens *S* im Glasführungsrohr *Gl* so befestigten (Glycerin als Gleitmittel), daß die Kapillarpipette in jeder gewünschten Lage gehalten wird. Dadurch gelang uns nicht nur das Einsinken der Waschpipette in das Filterpapier zu vermeiden, sondern auch durch entsprechende Einstellung des Hahnes *H* den Alkoholzufluß so zu regeln, daß er nicht den Rand des Ofens überschreiten kann.

Das Lämpchen *L* ermöglicht es, den Auswaschvorgang besser zu ver-

folgen, da der innere Rand des Ringofens durch die Beleuchtung von unten sichtbar wird. Diese Beleuchtung wird man jedoch vorteilhaft nur fallweise einschalten, um die Wirkung des Ringofens nicht zu schwächen (Drucktaster). Zur Fixierung des Filterpapieres auf dem Ringofen hat sich ein Plexiglasring *Pl* mit kleinem Haltegriff wegen seiner Durchsichtigkeit gut bewährt.

Da die Färbung der Ringe eine gute Proportionalität zur Fluorionenkonzentration aufweist, erscheint es durchaus möglich, diese Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Fluorionen heranzuziehen, um so eventuell direkt im Destillat der Willard-Winterschen Methode den Fluorgehalt zu ermitteln. Versuche in dieser Richtung sind im Gange und es wird darüber noch berichtet werden. Hierbei werden auch andere Triphenylmethanfarbstoffe, wie z. B. das von *F. Feigl* und *D. Goldstein*[4] zum selektiven Aluminiumnachweis empfohlene Chromechtreinblau B und Naphthochromgrün G der Firma Ciba in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassung

Es wird ein qualitativer Fluornachweis mit dem Aluminiumlack des Chromazurol S bei $p_H \sim 4{,}3$ mittels einer verbesserten Ringofenmethode durch kontinuierliches Auswaschen des freigesetzten Farbstoffes mit Alkohol beschrieben. Die Erfassungsgrenze beträgt 0,005 μg Fluor.

Summary

A description is given of a qualitative test for fluorine by means of the aluminium lake of chromeazurole S at p_H 4,3. It includes an improved ring oven method with continuous washing out of the liberated dyestuff with alcohol. The identification limit is 0,005 μg.

Résumé

Description d'un mode d'identification du fluor à l'aide de la laque d'aluminium du chromazurol S à p_H 4,3 et par application d'une technique améliorée de la méthode du four annulaire comportant un lavage continu par l'alcool de la matière colorante libérée. La limite d'identification est de 0,005 μg de fluor.

Literatur

[1] *B. J. Macnulty, G. J. Hunter* and *D. G. Barrett*, Analyt. Chim. Acta **14**, 368 (1956).
[2] *B. J. Macnulty* and *L. D. Woollard*, Analyt. Chim. Acta **14**, 452 (1956).
[3] *H. Weisz*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 667.
[4] *F. Feigl* und *D. Goldstein*, Analyt. Chemistry **29**, 456 (1957).

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften

Symposium on Micro-Chemistry, 1958

President: Professor M. Stacey, F. R. S.

A Symposium on Microchemistry will be held in the University of Birmingham over the period 20th–27th August, 1958, both dates inclusive. This Symposium will be held under the auspices of the Society for Analytical Chemistry and is being organised by the Midlands Section and Microchemistry Group.

It will consist of original papers and recent advances in microchemical techniques, presented by a number of chemists of international repute. The subjects will include:

Inorganic and Organic Qualitative and Quantitative Analysis,
Absorptiometry,
Chromatography,
Polarography,
Emission Spectrography,
Radio Chemistry,
Chemical Microscopy,
Thermogravimetric Analysis,
Biochemical Methods,
Industrial Applications,
Teaching, etc.

An exhibition of new and special apparatus will be held simultaneously, and visits to local places of interest will be organised.

A Ladies' Committee has been formed to organise entertainment for nonscientific visitors.

Registration forms and further information may be obtained on application to the Symposium Secretary:

W. T. Elwell, F. R. I. C., I. C. I. (Metals Division) Ltd., P. O. Box No. 216, Research Department, Kynock Works, Witton, Birmingham 6.

Envelopes should be marked "Symposium".

The Society for Analytical Chemistry

Ordinary Meeting of the Society

An Ordinary Meeting of the Society, organised by the Physical Methods Group, was held at 7 p. m. on Wednesday, April 3rd, 1957, in the Meeting Room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1. The Chair was taken by the President, Dr. *J. H. Hamence*, M. Sc., F. R. I. C.

The subject of the Meeting was "Fluorimetry" and the following papers were presented and discussed:

"The Spectrometry of Fluorescence", by *E. J. Bowen*, M. A., D. Sc., F. R. S. (Oxford University).

Constant deviation spectrographs may be easily fitted with a photomultiplier at the exit slit to be used for the quantitative determination of fluorescence spectra. Such an arrangement can be used as an ordinary fluorimeter, with the added advantages given by a knowledge of the nature of the light emitted. Measurements can be made at low temperatures when phosphorescence as well as fluorescence may be observed. To obtain the most reliable results attention must be paid to a number of factors such as photochemical change, quenching of fluorescence, temperature and wavelength of exciting light.

When plots of fluorescence curves are to be published it is necessary that their form should be entirely independent of instrumental characteristics. The rational choice for the ordinate of the curve is relative numbers of quanta emitted, and as there are good arguments for using wave-number as abscissae rather than wavelength, the quantum emission must be evaluated on the basis of equal intervals of wave-number. The method of carrying this out was presented.

"Some Experiments with Spectrofluorimeters and Filter Fluorimeters", by *C. A. Parker*, B. Sc., Ph. D., F. R. I. C. (Admiralty Research Laboratory).

Fluorescence emission spectra of liquids have been measured using laboratory-made accessories in conjunction with a small monochromator, photomultiplier and commercially-available A. C. amplifier. The apparatus can also be used for the measurement of fluorescence "excitation" spectra, or as a simple filter fluorimeter where high sensitivity is required. Examples of the analytical application of fluorescence emission spectra were given. A dewar vessel for the measurement of low temperature luminescence or absorption was also described.

Some general considerations, of particular importance in quantitative work were: wavelength of exciting light and its intensity, photodecomposition, innerfilter effect, reversible quenching and irreversible oxidation by molecular oxygen, and temperature. These were discussed in relation to the system $R + X = RX$, in which the concentration of X was measured by the addition of a reagent to give the fluorescent compound RX. Examples were taken from work recently carried out on the reaction of borate with benzoin.

Simple chemical actinometry was recommended for the measurement of exciting intensities, particularly where instrumental sensitivities were quoted, or relative sensitivities with different exciting wavelengths have to be determined.

"Spectrofluorimetry", by Professor *R. T. Williams*, D. Sc., Ph. D. (St. Mary's Hospital Medical School).

Fluorimetric assays are usually highly sensitive, but in the past they have been restricted to a relatively small number of compounds, and this has been largely due to the unavailability of activating light of high intensity over a wide range of wavelengths and to restriction of fluorescence to the visible spectrum. Classical fluorimetric methods have depended on the few

lines of the mercury emission spectrum as activating sources, and compounds activated by these lines usually emit fluorescence in the visible.

Recently instruments have been devised (Aminco-Bowman spectro-photofluorometer; Farrand spectrofluorometer) which are capable of delivering high intensity monochromatic activation at all wavelengths from 220–800 mμ and, at the same time, of automatically analysing the fluorescence emitted, over the same range. Compounds, which, hitherto, were not considered fluorescent have now been found to fluoresce in the ultraviolet. Others have been found to fluoresce in the visible because they are activated by light of wavelengths other than those emitted by the mercury arc. Thus phenol (at p_H 1) fluoresces at 310 mμ when activated by light of wavelength 270 mμ; aniline (p_H 7) fluoresces at 340 mμ with an activation at 280 mμ. Other examples were given and comments were made on the effect of p_H and structure on fluorescence.

With these instruments it is also possible to plot readily fluorescence spectra and the corresponding activation spectra which can be used in identification. Fluorescent compounds can also be analysed readily in concentrations of 0.01 μg/ml and in extreme cases in amounts of 0.0001 μg/ml.

"A Direct Reading Fluorimeter", by *L. Brealey*, B. Sc., and *R. E. Ross*, A. M. Brit. I. R. E. (Boots Pure Drug Co. Ltd.).

A direct reading fluorimeter has been constructed which is well suited to routine analytical work. Short-term and long-term stability are good and sensitivity is high.

Detection is by photomultiplier, the voltage supply to which is controlled by the illuminating lamp in such a way that the output reading is independent of light fluctuations. The overall stability of the system is such that the mains voltage can vary between 200 and 250 volts without causing more than $\pm$ 0.5 per cent variation on the instrument reading.

No fluorescing comparison solution is required for operation and sample handling is reduced to a minimum. Either run-through or ordinary cuvettes can be used, the former method being the one of choice for routine assay where there is a reasonable volume of solution available.

The instrument is now being produced commercially and a model was demonstrated.

Biological Methods Group

An Ordinary Meeting of the Biological Methods Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 7 p. m. on Thursday, April 4th, 1957, in the Meeting Room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1. The Chair was taken by the Chairman of the Group, Dr. *S. K. Kon*, F. R. I. C.

The following papers were presented and discussed:

"Experience in the Microbiological Assay of Vitamins and Amino-acids by Large Plate Methods", by *D. F. Harris* and *J. S. Simpson*, F. I. M. L. T. (Glaxo Laboratories Ltd.).

This note summarised the work carried out to evolve satisfactory large plate methods for the microbiological assay of riboflavine, aneurine hydrochloride, nicotinic acid, calcium *d*-pantothenate, biotin, folic acid, tryptophan and other amino-acids.

These methods have proved superior to the petri dish and tube methods normally recommended. A high throughput of samples, a marked saving in equipment and time required and an improved precision ($\pm$ 11 per cent. $P = 0.95$) have been found.

6×6 Latin square plates for each assay were available for demonstration.

"Quantitative Analysis of Immunologically Specific Substances in Agar Gel Plates", by *J. G. Feinburg*, B. Sc., D. V. M., M. Sc. (Beecham Research Laboratories).

Specific antigenic substances can only be demonstrated *in vitro* in relationship to their specific antibodies.

Precipitation between soluble antigens and their antibodies in fluid media was one of the earliest observed phenomena and quantitative analytical methods based on this reaction considerably advanced the science of immunology.

Within the past decade a whole new school of immunological investigation has been born with the discovery that specific precipitates could be formed and stabilised in agar gels when antigens and antibodies are allowed to diffuse through the gel. Good but intricate and tedious, quantitative analytical methods have been devised for gel diffusion in Oudin tubes.

Recently a quantitative method has been devised using the more convenient method of diffusion in Ouchterlony plates (*Feinburg*, Nature, 1956, 177, 530). This method was described in detail and illustrated with lantern slides and demonstrations.

Ordinary Meetings of the Midlands Section

An Ordinary Meeting of the Midlands Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 7 p. m. on Thursday, March 28th, 1957, in the Gas Showrooms, Nottingham. The Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *R. Belcher*, F. R. I. C., F. Inst. F.

A discussion on "The Analysis of Complex Sulphur Compounds" was opened by *C. E. Kendall*, B. Sc., A. R. I. C. (Dunlop Research Centre).

The application of absorption spectroscopy to the identification and estimation of organic sulphur compounds were described, with special reference to substances used in the rubber industry. The electronic spectra of various types of sulphur compound were considered, including sulphur derivatives of carbonic acid and carboxylic acids, hetero-compounds containing sulphur and aromatic compounds with sulphur groups as substituents. The infra-red spectra of some types of sulphur compounds were briefly considered.

An Ordinary Meeting of the Midlands Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 7 p. m. on Wednesday, April 10th, 1957, in the Mason Theatre, The University, Edmund Street, Birmingham 3. The Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *R. Belcher*, F. R. I. C., F. Inst. F.

The following paper was presented and discussed:

"The Analytical Chemistry of Beryllium", by *E. Booth* (U. K. A. E. A., Woolwich).

The past decade or so has witnessed the widespread application of beryllium into many fields. The chemistry of the element and in particular the analytical chemistry, was discussed against this background.

Whilst the analytical procedures are generally conventional with adaptions to beryllium chemistry, the published methods are relatively few and often controversial.

The lecture attempted to cover most of the aspects of the analysis of beryllium and its compounds, including ore analysis, gravimetric, volumetric, spectrophotometric and spectrographic methods, and outlined those methods which had been shown in the light of experience to be the most satisfactory.

Ordinary Meeting of the Physical Methods Group

The 58th Ordinary Meeting of the Physical Methods Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 6.30 p. m. on Tuesday, 21st May, 1957, in the meeting room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London W. 1. The subject of the meeting was Electrochemistry and the Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *J. E. Page*, B. Sc., F. R. I. C.

The following papers were presented and discussed:

"Coulometric Titrations with an Integrated Current Source", by *L. E. Smythe*, Ph. D. (Australian Atomic Energy Commission). Paper presented by *G. W. C. Milner*, M. Sc., F. R. I. C., A. Inst. P. (U. K. A. E. A., Harwell).

Equipment generally available for coulometric titrations was briefly reviewed. The advantages of a direct reading coulometer were illustrated by description of an integrated current source for automatic coulometric titrations. The precision and accuracy attainable for a variety of estimations, indicate the possibilities of the equipment for the analysis of constituents in the microgram and milligram ranges. The equipment for automatic coulometric titrations was demonstrated.

"Pulse Polarography", by *A. W. Gardner*, B. Sc. (U. K. A. E. A., Harwell).

A pulse polarograph is an electronic polarograph of high sensitivity and resolving power giving both normal and derivative polarograms. To obtain a normal polarogram the dropping mercury electrode is held for most of the time at a predetermined potential with respect to the anode of the polarographic cell but at a certain time in the life of each mercury drop a polarising pulse changes the drop potential for $^1/_{25}$ second to a value which gradually becomes more negative while the polarogram is being recorded.

Electronic circuits compute and record the difference between the average cell current during the second half of the polarising pulse and the corresponding current which would have occurred if the drop potential had not changed. The same circuits are used to obtain a derivative polarogram but in this case the drop potential slowly changes while the polarogram is being recorded and the size of the polarising pulse is held constant.

Some results were presented and the instrument demonstrated.

Joint Summer Meeting

A Joint Meeting of the Western and Midlands Sections of the Society for Analytical Chemistry was held at the Queen's Hotel, Cheltenham, on Friday, May 31st, and Saturday, June 1st, 1957. The Chair was taken by the Chairman of the Western Section, Mr. *P. J. C. Haywood*, B. Sc., F. R. I. C., on Friday evening and by the Chairman of the Midlands Section, Dr. *R. Belcher*, D. Sc., Ph. D., F. R. I. C., on Saturday morning.

The following papers were read and discussed:

Friday, May 31st, at 6.30 p. m.

"Recent Advances in the Analysis of Plastics", by *J. Haslam*, D. Sc., F. R. I. C. [Chief Analyst, I. C. I. (Plastics) Ltd.]

The paper dealt with the examination of Nylon and related polymers and particularly with their chromatographic testing.

Other problems discussed were concerned with polymeric plasticisers for polyvinyl chloride and miscellaneous tests for the examination of urea formaldehyde syrups, phenol formaldehyde moulding powders and toxic atmospheres containing acrylonitrile.

The use of automatic titrimeters and the application of gas-liquid chromatography in the general work of a plastics analytical laboratory were dealt with.

Saturday, June 1st, at 9.30 a. m.

"The Analysis of Titanium, Zirconium, and their Alloys", by *W. T. Elwell*, F. R. I. C. [I. C. I. (Metals) Ltd.]

Only within the past few years had titanium metal become a commercial product. It was not surprising, therefore, that published data covering methods of analysis were scanty. The rapid growth of the titanium industry, the increasing use of the metal and the development of an ever increasing number of titanium alloys, made it essential that information on analytical methods should be available.

More recently, zirconium metal had been given special metallurgical attention and this, in turn, had necessitated the development of suitable analytical procedures for the chemical examination of this metal and its alloys. In the course of considerable research over the combined fields of titanium and zirconium technology, Imperial Chemical Industries Limited had given much attention to analytical procedures for the determination of a large number of elements in these metals and their alloys, whether present as impurities or purposefully added, and the lecturer, who is Metals Division Chief Analyst, discussed the latest developments in this new branch of analytical chemistry.

"The Analysis of the Rarer Elements of Group III", by *A. R. Powell*, F. I. M., F. R. I. C., F. R. S. (Johnson, Matthey & Co. Ltd.)

Group III A Sc, Y and Rare Earths.

Decomposition of minerals. Separation of rare earths by homogeneous oxalate precipitation. Separation of thorium and cerium by solvent extraction and precipitation methods. Division of the rare earths into groups. Spectrophotometric determination of the coloured earths. Polarographic determination of Eu and Yb. Solvent extraction of Sc and its separation from Th and the rare earths.

Group III B Ga, In, Tl.

Separation from the common elements and from one another by solvent extraction and precipitation processes. Rapid methods of eliminating interfering elements. Gravimetric and volumetric methods of determining the elements. Electrolytic deposition.

Société de chimie industrielle

Groupe de la chimie analytique

Compte-rendu de la séance du 7 Mars 1957

Président: M. le Professeur *Delaby*.
Président du Groupe: M. *Roger*.
Vice-Présidents: M. *Charlot*, M. *Navarro*.
Secrétaire: M. *Meraux*.
Le Professeur *Delaby* ouvre la séance à 17 h. 40.

M. *Roger* annonce la triste nouvelle du décès accidentel de Mademoiselle *Denise Bezier*, emportée par une avalanche. Mademoiselle *Bezier* faisait partie de notre Groupe. Ingénieur de l'Ecole de Physique et de Chimie, d'où elle était sortie major, Docteur-ès-Sciences, Sous-Chef de travaux à l'Ecole de Physique et Chimie, Collaboratrice du Professeur *Charlot*, elle avait contribué à l'évolution de la Chimie Analytique et collaboré avec le Professeur *Charlot* aux ouvrages sur l'Analyse qualitative que tous les étudiants en Chimie et les Chimistes ont entre les mains et qui leur rendent à chaque instant les plus grands services.

Elle avait également travaillé à la rédaction de rapports de la Commission Internationale des réactions et réactifs analytiques de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée.

Elle était la collaboratrice de la Société Française d'Organo-Synthèse ainsi que du Laboratoire *Roger Bellon*, également membre de notre Groupe.

Dans cette maison même, nous l'avons entendu prononcer de brillantes conférences sur l'analyse chimique et physico-chimique.

La disparition de Mademoiselle *Bezier* est une grande perte pour la Chimie Analytique.

Parmi les manifestations prochaines sur la Chimie Analytique, M. *Roger* signale tout particulièrement la séance que la Société Chimique de France tiendra le 22 Mars et dont l'organisation a été confiée au Professeur *Charlot*. Les membres de notre Groupe y sont cordialement invités.

M. *Roger* remercie tout particulièrement au nom du Groupe de la Chimie Analytique et en son nom, M. le Professeur *Delaby* d'avoir bien voulu accepter de présider cette séance et, dit-il, s'il est très sensible à l'honneur que nous fait M. le Professeur *Delaby* en tant que membre de l'Académie de Médecine, il est encore plus sensible à l'honneur que nous fait M. le Président en tant que Président de la Société Chimique de France.

Le Président présente ensuite M. *S. Vertalier*, Ingénieur au Centre de Recherches Analytiques de la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc qui nous parlera des «Applications micro-analytiques de la chromatographie gaz/liquide à la détection et au dosage des groupes «alcoxy».

La Méthode de chromatographie de partage en phase vapeur, qui a valu le prix *Nobel* à MM. *Martin* et *James*, a déjà de nombreuses applications et elle est appelée à un très grand avenir.

M. *Vertalier* nous expose une application qui en a été faite à son centre pour la séparation, l'identification et le dosage, à l'échelle submicro-analytique, des groupes «alcoxy».

On commence d'abord par transformer ces groupes selon la technique de *Zeisel* en dérivés correspondants. Les iodures sont ensuite distillés et retenus dans un piège refroidi par de la neige carbonique. On procède ensuite à la chromatographie.

La méthode s'applique aux groupes méthoxy et éthoxy présents dans la même molécule ou en mélange dans deux constituants. Pour le dosage dans un mélange, on compare le rapport des hauteurs de pics avec une courbe étalon préalablement établie et fixant les rapports OCH_3/OC_2H_5.

Un dosage global selon la méthode *Zeisel* permet de calculer les teneurs respectives en méthoxy et éthoxy.

Tous les iodures volatils peuvent être chromatographiés et on peut ainsi remonter à d'autres groupes alcoxy.

M. *Vertalier* a été très écouté.

Le Président *Delaby* regrette que cet appareil ne soit pas, pour le moment, construit en France, la méthode étant appelée à un très grand avenir pour l'analyse de tous les liquides volatils jusqu'à 200°, purs ou en mélange, et même les gaz. Mais, bien entendu, manipulation et interprétation sont délicates et il faut un opérateur entraîné aux problèmes à résoudre.

Le Président donne ensuite la parole à M. *F. Martin*, Directeur des Recherches Analytiques de la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc.

L'appareil présenté par M. *F. Martin* a été mis au point à la Société Rhône-Poulenc (MM. *Martin* et *A. Floret*). Il permet de doser très rapidement — en quinze minutes — le S par combustion dans les composés volatils: benzène, essences, ...

M. *F. Martin* nous commente l'opération pendant le développement d'un film en couleurs très réussi, montrant tous les détails de l'appareillage.

Celui-ci comporte:

1° Un carburateur-brûleur: le liquide arrive goutte à goutte dans un ballon en pyrex et vaporisé immédiatement dans un courant de CO_2.

2° Un chalumeau en Pyrex soudé sur le ballon, avec arrivée d'O. Les vapeurs de la substance sont brûlées grâce à cet O. Des pointeaux permettent de règler le débit. Un écran de protection peut venir se placer devant la chambre de combustion.

3° La chambre de combustion, placée horizontalement et dans laquelle on introduit le chalumeau brûleur.

4° Un absorbeur, réfrigérant vertical à grande capacité de lavage, malgré le faible volume de liquide absorbant.

L'appareil est entièrement rôdé.

Le liquide absorbant est une solution diluée de H_2O_2 dans l'eau (10 ml eau et 0,5 ml H_2O_2 à 110 vol.).

On brûle environ 1 ml par minute et en tout généralement 10 ml.

On peut ainsi également doser le S dans les gaz.

Le S est finalement dosé à l'état de SO_4H_2 par titrage: L'ion SO_4 est précipité en milieu hydro-alcoolique (70% de méthanol) par une solution titrée de perchlorate de Baryum en présence de thorin [sel disodique de l'acide o-(2 hydroxy 3-6 disulfo-1 naphtylazo) benzène arsinique] qui agit comme indicateur d'absorption. Virage du jaune au rose.

Pour les teneurs très faibles, SO_4H_2 est réduit dans un courant d'azote par un mélange de IH et ClH et d'acide hypophosphoreux. On obtient H_2S qui est transformé en bleu de méthylène en milieu ClH par le p-aminodiméthylaniline puis oxydation par un sel ferrique.

Le bleu de méthylène est enfin dosé colorimétriquement.

Les halogènes peuvent être dosés: on les dilue s'il y a lieu dans un solvant inflammable avant la vaporisation.

Les nombreuses questions posées à M. *F. Martin* montrent l'intérêt du sujet. M. *Martin*, connaissant à fond les possibilités de son appareil, renseigne

immédiatement le demandeur. La méthode s'applique-t-elle au gaz oil ? Non, celui-ci n'est pas assez volatil, se vaporise mal et la combustion devient rapidement mauvaise. Pourrait-on doser le S de cette façon dans le gaz de Lacq ? Certainement, en le diluant toutefois, étant donnée sa richesse en S. Pour doser le Cl dans un corps tel que le Tétrachlorure de Carbone, on le dilue dans un solvant inflammable. Pour des teneurs très faibles, on peut brûler des quantités plus grandes. Il n'est pas utile que la chambre de combustion et le brûleur soient en quartz, le Pyrex suffit et tient très bien.

Le Président lève la séance à 18 h. 50 en remerciant vivement les conférenciers. Il rappelle avec esprit que la Chimie Analytique demande beaucoup de connaissances de chimie, non seulement analytiques, mais aussi générales, et que le temps est révolu où l'analyste était relégué à l'arrière plan dans l'entreprise qui l'occupait.

Compte-rendu de la séance du 4 Avril 1957

Le Président ouvre la séance à 17 h. 35.

Il informe les auditeurs de l'élection de notre Vice-Président le Professeur *Clément Duval*, à l'Académie des Sciences, Belles Lettres et Arts de *Rouen*, à l'occasion des fêtes du tricentenaire de la naissance de *Fontenelle* et du bicentenaire de sa mort.

Le Président adresse au nom du Groupe et en son nom les plus vives félicitations à M. *Cl. Duval*.

Puis, il donne la parole à M. *Kuhn*, Chef de la Division des Etudes Physico-Chimiques du Centre Technique des Industries de la Fonderie, sur le sujet «*Nouvelle Méthode d'Analyse des alliages cuivreux*».

Les méthodes normalisées, déjà anciennes, ne donnent plus satisfaction à l'heure actuelle et seront d'ailleurs modifiées par l'*Afnor* qui réunira la Commission compétente.

Les analyses de comparaison faites par 50 Laboratoires sous la direction du C. T. I. F. ont montré de graves discordances par l'application de ces méthodes.

Dans la méthode de M. *Kuhn*, étudiée au C. T. I. F., l'alliage est entièrement mis en solution par une attaque nitro-fluorhydrique, déjà préconisée par *Ravner* et *Veitsblit* et reprise par *Goldberg*.

On évite ainsi les problèmes posés par les entraînements de métaux dans le précipité d'acide métastannique.

Mais il faut attaquer dans des récipients de platine, dont on ne dispose pas toujours en assez grand nombre pour des analyses de série. Les récipients en matière plastique ne peuvent convenir, car il faut aller à l'ébullition commençante en fin d'opération.

Le milieu fluo-borique étant moins agressif pour le verre, c'est celui qui a été adopté. On réduit encore l'attaque du bécher en le traitant par une solution de silicone à 5% qui laisse une couche protectrice.

Après l'attaque (sur 2 g), on transvase dans un bécher en matière plastique pour l'électrolyse en milieu nitrique-fluorhydrique-borique de Cu et Pb. On ajoute au préalable un excès de HF pour éviter que Sn ne dépose avec Pb et on ajoute du Sulfate d'ammonium après le dépôt du Pb, selon la méthode classique, et de l'urée pour détruire l'acide nitreux et faciliter le dépôt complet du Cu. Dans ces conditions, Mn ne se dépose pas avec Pb, au moins pour les teneurs habituelles de Mn et Pb dans les bronzes courants.

Après électrolyse, on évapore en présence de SO_4H_2 pour chasser HF, et tous les autres éléments peuvent alors donner leurs réactions analytiques habituelles, les complexes étant détruits.

On effectue les autres dosages sur parties aliquotes.

Sn est titré à l'iode après réduction par une plaquette d'Al. Il peut être dosé par titrage à l'Iode selon la méthode de M. *Dozinel* (attaque par HCl + + H_2O_2, on catalyse par $HgCl_2$ et après réduction à l'hypophosphite de sodium, on ajoute de la neige carbonique qui produit à la fois le refroidissement désirable et le dégagement de CO_2 qui met à l'abri de l'O de l'air le $SnCl_2$).

Fe est dosé par photocolorimétrie à l'ortho-phénantroline après réduction à l'état ferreux par le chlorhydrate d'hydroxylamine.

Ni est dosé de même, à l'état de complexe oxydé (à l'iode) par la diméthylglyoxime, ou encore par polarographie.

Zn est titré par le versénate en présence de noir ériochrome.

Mn par la méthode colorimétrique au périodate.

Al par l'oxinate.

Sb par colorimétrie à la rhodamine B ou à l'état d'iodo-antimonite de K (colorimétrie de *Holler* améliorée par M. *Kuhn* par addition d'acide oxalique qui permet l'opération en présence d'Sn.

S est dosé par combustion dans l'O au four électrique à 1250° par iodométrie ou acidimétrie de SO_4.

Une discussion fort intéressante a lieu ensuite, principalement conduite par M. *Dozinel* de Bruxelles. En particulier, M. *Dozinel* parle de son dosage iodométrique de Sn cité plus haut, qui est d'une excellente précision. Il critique l'emploi actuel du périodate pour doser colorimétriquement le Mn, réactif couteux, dont à son avis il est fait un emploi abusif, quand le persulfate en présence de nitrate d'argent suffit et donne une teinte stable pendant une semaine.

M. *Navarro* intervient pour signaler qu'il peut se produire une précipitation de sous-oxyde d'argent, gênante, qu'on évite par addition d'acide acétique.

La méthode complète de M. *Kuhn* sera publiée prochainement dans «*Chimie Analytique*».

Le Président lève la séance à 19 h. 20.

Compte-rendu de la séance du 2 Mai 1957

Le Président, M. *L. Roger*, ouvre la séance à 17 h. 35. Il annonce 7 nouvelles adhésions au Groupe:

Les six premières proviennent du laboratoire de notre Vice-Président, le Professeur *Cl. Duval*. Ce sont: Mesdames *Thérèse Dupuis*, *Christiane Cabanne*, *Micheline Villange*, Mesdemoiselles *Claude Rocchiccioli*, *Colette Wadier*, *Yvette Servigne*. La septième est celle de M. *Charles Witte*, Ingénieur-Chimiste au Laboratoire de la S. N. C. F.

Le Président passe ensuite la parole à M. *Cl. Duval* sur «Nouvelles idées sur la constitution des sels d'uranyle».

On admet généralement que les sels solubles d'uranium VI donnent naissance dans l'eau à un cathion UO_2^{++} dit uranyle qui serait responsable de la couleur jaune de ces sels.

Quand on fait l'électrolyse d'un sel d'uranyle (chlorure par exemple) on forme à la cathode l'oxyde UO_3 jaune et pur. Il se dégage H_2. On s'explique mal cette oxydation présumée en milieu réducteur si la formule UO_2Cl_2 est exacte.

Si dans le tube à robinets servant à effectuer les expériences de migration et de piégeage d'ions, on dispose une solution de chlorure d'uranyle et dans les branches du NO_3Na (17 mA/110 V): *l'Uranium se dirige vers chaque branche*. Le chlorure d'uranyle est donc un autocomplexe. En partageant en deux

le contenu de la branche anodique, et en dosant U et Cl, on trouve pour le rapport U/Cl la fraction 1/6. *L'anion du chlorure d'uranyle* renferme donc le groupement UCl_6.

Le spectre I. R. du chlorure d'uranyle montre une bande forte pour 940—946 cm^{-1}, bande qui se retrouve dans tous les sels d'U et dans les complexes d'U hexavalent, parfois déplacée jusqu'à 920 cm^{-1}. L'oxyde jaune la donne aussi très facilement, ainsi que le peroxyde $UO_3H_2OH_2O_2$. Rappelons qu'un corps anhydre non combinable à l'eau, donne le même spectre I. R. qu'à l'état solide et, en solution diluée, les mêmes max. d'absorption.

Par contre, on ne trouve aucune bande pour UO_2, tout au moins jusqu'à 38 mμ, ni pour les oxydes intermédiaires entre UO_2 et UO_3, en particulier pour U_3O_8. UCl_6 est également transparent.

Nous retiendrons de cette étude que UO_3 et UO_2Cl_2 présentent le même spectre dans la région du sel gemme. On peut essayer de tripler la formule et écrire $UCl_6 2\,UO_3$. Si nous concilions ce schéma conforme à l'expérience, avec l'existence de trois ions en solution, on peut faire l'hypothèse que 2 molécules d'eau pénètrent instantanément dans cet édifice lors de la dissolution et donnent $UCl_5(OH)_2(UO_3H)_{22}$.

Cette hypothèse est confirmée par l'expérience: en faisant l'enregistrement de la solution saturée de chlorure d'uranyle (Perkin-Elmer) à double faisceau équipé au fluorure de calcium on observe dans la région de 3 μ, à la fois la bande propre de l'eau et la bande caractéristique des groupes OH associés.

La formule UO_2Cl_2 pour le sel d'uranyle est donc très douteuse ainsi que l'existence du cathion UO_2^{++}.

M. *Cl. Duval* a effectué cette étude sur le chlorure car Cl est transparent dans la région 900 cm^{-1}.

Le Président présente ensuite le Dr. *Hausdorff*, Directeur des recherches en Europe de la Société *Perkin-Elmer*, et lui passe la parole sur «la chromatographie en phase vapeur, nouvelle et puissante méthode pour la Chimie Analytique».

Les premiers essais de chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des gaz, en 1930, n'obtiennent que peu de succès (mauvaises séparations dues aux absorbants mal choisis).

En 1941, le Dr. *Martin* effectue la chromatographie liquide-liquide. La chromatographie en phase vapeur fait son apparition en 1953.

Principe: On utilise 3 méthodes pour l'analyse d'un mélange en phase gazeuse: 1° Déplacement absorption. 2° Partage. 3° Elution. Déplacement: L'échantillon est introduit dans une colonne contenant l'absorbant solide. Les constituants du mélange sont déplacés par un gaz inerte saturé des vapeurs d'un liquide à point d'ébullition élevé qui sera fortement absorbé tandis que les constituants de l'échantillon sont déplacés sur la colonne selon leur affinité pour la substance absorbante et sortent de la colonne séparément. On obtient par enregistrement graphique de la conductibilité thermique, des paliers caractéristiques pour chaque composé, paliers dont la longueur est fonction de la concentration. Mais la régénération de la colonne est difficile à effectuer.

La méthode la plus utilisée actuellement est la combinaison de l'élution et du partage, sauf dans le cas des gaz inertes pour lesquels on utilise encore le déplacement. La colonne peut être remplie d'une substance solide (chromatographie par absorption) ou remplie d'une substance solide inerte et d'un liquide à point d'ébullition élevé (chromatographie par répartition).

Dans la méthode d'élution, le courant gazeux (Azote, Hélium) est maintenu de façon constante. Les composants sortent séparément de la colonne.

Temps de rétention × Débit du gaz porteur = volume de rétention. Ce volume de rétention est une caractéristique du composé cherché.

Quand on a établi ces valeurs de repères, on peut procéder à l'analyse.

La conférence est agrémentée de nombreuses projections destinées à faire comprendre le détail des opérations (par ex. introduction d'une quantité exactement mesurée d'un mélange gazeux ou d'un liquide à analyser).

Les applications de la chromatographie sont les analyses qualitatives et quantitatives d'un mélange gazeux.

Dans l'analyse quantitative, chaque composé d'un mélange gazeux donne par enregistrement de la conductibilité thermique, un pic dont la hauteur ou la surface sont proportionnelles à la quantité de ce composé dans le mélange, On calcule la surface en multipliant la hauteur par la largeur prise à la demi-hauteur du pic.

Si l'on fait la détermination d'après la hauteur du pic, la température à laquelle est effectuée l'analyse a une grande influence. Par contre, si on effectue cette détermination d'après la surface, c'est la vitesse du gaz qui doit être constante.

Sur les appareils récents, c'est la détermination d'après la surface des pics qui sera la plus favorable.

Une colonne chromatographique de 1 mètre correspond à une colonne de distillation fractionnée de 800 à 1000 plateaux.

Pour le calcul du pourcentage de chaque constituant, on peut utiliser 3 méthodes:

1° On détermine la somme des surfaces de tous les pics, ce qui donne le % total, ensuite la surface de chaque pic donne le % de chaque constituant. Cependant, pour les produits gazeux à bas point d'ébullition, la méthode ne donne pas encore satisfaction car la conductibilité thermique n'est pas stable. On se sert alors de la hauteur des pics. On détermine sur un mélange de composition connue la «calibration» c à d la concentration en fonction de la hauteur des pics; on trace la courbe correspondante. Sur le mélange inconnu, qui doit contenir les mêmes constituants, la hauteur des pics donne le pourcentage de chaque constituant. Cette méthode ne nécessite pas l'introduction d'un volume connu du mélange gazeux.

2° Méthode dite du standard interne. On ajoute un standard interne de composition connue. Pour un mélange gazeux quelconque, on fait le rapport entre les hauteurs des pics.

3° Lecture directe. On injecte plusieurs quantités d'un mélange connu. Les différentes courbes donnent la conductibilité thermique. En opérant à la même temperature et dans les mêmes conditions, on atteint la composition du mélange.

Avec une même colonne, on ne peut pas toujours séparer tous les constituants d'un mélange. On doit alors utiliser plusieurs colonnes et, dans ce cas, interférer les résultats.

Pour un dosage de traces dans un mélange renfermant une forte proportion d'un constituant, on change la sensibilité.

Le plus grand inconvénient de la chromatographie en phase liquide est que l'écart des points d'ébullition des différents constituants ne doit pas dépasser 70° environ, mais de nouveaux appareils permettent un écart plus large.

Le Président lève la séance à 19 h. 20.

Abkürzungen	Abbreviations	Abréviations
Acta Chem. Scand.	Acta Chemica Scandinavica
Amer. J. Physiol.	American Journal of Physiology
Analyst	The Analyst
Analyt. Chemistry	Analytical Chemistry
Analyt. Chim. Acta	Analytica Chimica Acta
Angew. Chem.	Angewandte Chemie (bis 1932 Zeitschrift für angewandte Chemie)
Ann. Chem.	Liebigs Annalen der Chemie
Ann. chim.	Annales de chimie
Ann. Physik	Annalen der Physik
Ann. physique	Annales de physique
Arch. Biochemistry	Archives of Biochemistry
Arch. Pharmaz.	Archiv der Pharmazie und Berichte der deutschen pharmazeutischen Gesellschaft
Arch. sci. phys. nat.	Archives des sciences physiques et naturelles
Ark. Kemi (Mineral. Geol.)	Arkiv för Kemi (Mineralogi och Geologi)
Atti accad. Lincei (Rend.)	Atti della accademia nazionale dei Lincei (Rendiconti)
Ber. dtsch. chem. Ges.	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (bis 1944)
Biochemic. J.	Biochemical Journal
Biochem. Z.	Biochemische Zeitschrift
Biochim. Biophys. Acta	Biochimica et Biophysica Acta
Bull. soc. chim. Belgique	Bulletin de la société chimique de Belgique
Bull. soc. chim. biol.	Bulletin de la société de chimie biologique
Bull. soc. chim. France	Bulletin de la société chimique de France
Canad. J. Chem.	Canadian Journal of Chemistry
Chem. Abstr.	Chemical Abstracts
Chem. and Ind.	Chemistry and Industry
Chem. Ber.	Chemische Berichte
Chem. Eng. News	Chemical and Engineering News
Chemie	Die Chemie (1942—1945)
Chem. Fabrik	Die chemische Fabrik (bis 1941)
Chem. Industrie	Die chemische Industrie
Chem. Ing. Techn.	Chemie-Ingenieur-Technik
Chem. Weekbl.	Chemisch Weekblad
Chem. Zbl.	Chemisches Zentralblatt
Chem.-Ztg.	Chemiker-Zeitung
C. r. acad. sci., Paris	Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences, Paris
Exper.	Experientia
Gazz. chim. ital.	Gazzetta chimica italiana
Helv. Chim. Acta	Helvetica Chimica Acta
Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed.	Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition (bis 1947)
J. Amer. Chem. Soc.	Journal of the American Chemical Society
J. Biol. Chem.	Journal of Biological Chemistry
J. Chem. Education	Journal of Chemical Education
J. Chem. Physics	Journal of Chemical Physics
J. Chem. Soc. London	Journal of the Chemical Society London
J. Chem. Soc. Japan	Journal of the Chemical Society of Japan
J. Gen. Chem. USSR	Journal of General Chemistry USSR
J. Org. Chem.	Journal of Organic Chemistry

J. Physic. Chem.	Journal of Physical Chemistry
J. Physic. Coll. Chem.	Journal of Physical and Colloid Chemistry
J. Physiol.	Journal of Physiology
J. Polymer Sci.	Journal of Polymer Science
J. prakt. Chem.	Journal für praktische Chemie (bis 1943)
J. Soc. Chem. Ind.	Journal of the Society of Chemical Industry
Klin. Wschr.	Klinische Wochenschrift
Kolloid-Beih.	Kolloid-Beihefte
Kolloid-Z.	Kolloid-Zeitschrift
Mikrochem.	Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta (bis 1953)
Mikrochim. Acta [Wien]	Mikrochimica Acta
Mh. Chem.	Monatshefte für Chemie
Nature	Nature (London)
Naturwiss.	Die Naturwissenschaften
Österr. Chem.-Ztg.	Österreichische Chemiker-Zeitung
Physik. Z.	Physikalische Zeitschrift
Proc. Roy. Soc. London	Proceedings of the Royal Society of London
Rec. trav. chim. Pays-Bas	Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas
Science	Science
Svensk Kem. Tidskr.	Svensk Kemisk Tidskrift
Trans. Faraday Soc.	Transactions of the Faraday Society
Z. analyt. Chem.	Zeitschrift für analytische Chemie
Z. anorg. Chem.	Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie
Z. Elektrochem.	Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie
Z. Naturforsch.	Zeitschrift für Naturforschung
Z. Kristallogr.	Zeitschrift für Kristallographie, Kristallgeometrie, Kristallphysik, Kristallchemie
Z. Physik	Zeitschrift für Physik
Z. physik. Chem.	Zeitschrift für physikalische Chemie
Z. physiol. Chem.	Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie

Die Autoren werden dringend gebeten, bei allen Literaturzitaten anzugeben:

1. Titel der Zeitschrift in obenstehender Abkürzung,
2. Eventuelle Serienzahl in eckiger Klammer,
3. Bandzahl unterstrichen,
4. Seitenzahl,
5. Jahreszahl in runder Klammer.

The authors are urged to cite all the references as follows:

1. Abbreviated title of the periodical according to the above list,
2. eventual number of series, enclosed in crotchets (square brackets),
3. number of volume, underlined,
4. page-number,
5. year, enclosed in parentheses (round brackets).

Les auteurs sont instamment priés d'indiquer leurs sources comme suit:

1. titre abrégé du périodique selon liste ci-dessus,
2. numéro éventuel de la série, entre crochets,
3. numéro du volume, souligné,
4. page,
5. année, entre parenthèses ordinaires.

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag in Wien, I., Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien, XIX., Chimanistraße 21
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien, IX., Lustkandlgasse 52